

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-
açúcar por fungos**

Luiz Fernando Romanholo Ferreira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luiz Fernando Romanholo Ferreira
Biólogo

Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos

Orientadora:
Prof^a. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ferreira, Luiz Fernando Romanholo

Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por
fungos / Luiz Fernando Romanholo Ferreira. - - Piracicaba, 2009.
134 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Biodegradação 2. Bioensaios 3. Enzimas 4. Extresse oxidativo 5. Fungos 6. Vinhaça
I. Título

CDD 589.2
F383b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, pois sem ele, nada seríamos e nada conseguiríamos, tornando-nos capazes e fortes para enfrentarmos todos os desafios da vida.

Aos meus pais Manoel Henrique e Ana Maria, aos meus irmãos Fabiano, Gustavo Emílio e Túlio Henrique, pelo amor, compreensão e felicidades durante esta jornada.

Dedico.

*"A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério.
Essa é a fonte de toda arte e ciências verdadeiras"*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À ESALQ – USP pelo suporte como instituição e todos os apoios fornecidos e, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À coordenação do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola.

À querida Prof^a. Dra. Regina Monteiro, pela orientação, amizade, acolhimento, oportunidade, muita compreensão e incentivo ao longo desses anos de trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pelo fornecimento de material e disponibilidade para a realização dos ensaios com enzimas do estresse oxidativo.

À Usina Sucroalcooleira COSAN, pelo fornecimento de vinhaça.

Aos Professores do Curso de Pós Graduação pelo incentivo e ensinamentos.

À Prof^a. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopes pelos ensinamentos básicos, pelo incentivo, amizade e modelo de profissionalismo e a todos da UFAL, onde me formei. Aos amigos que conquistei durante a graduação e aos professores pelo incentivo, conhecimento e por acreditarem no potencial dos seus alunos.

Aos meus colegas de pós-graduação do curso de Microbiologia Agrícola, pelas confraternizações e, por compartilharem conhecimento, alegria e o espaço de trabalho sem esquecer os conselhos indispensáveis.

A todos os Professores e funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA).

À técnica Rosângela Aparecida pelo auxílio, carinho e amizade.

Aos meus amigos de laboratório: Mario, Tâmara, Georgia, Cristiane, Vivian, Milena, Laise, Maria Júlia, Maria Alice, Nuno, Gabriela, Ana, Cecília e Rosângela pela ajuda em todo o projeto.

Aos amigos e amigas do vôlei: Rafael Armas, Rafael Leal (Fiel), Paula, Xiua, Saly, Aurélio, Guy, Thiago e Eduardo.

A todos os meus amigos de Maceió, em especial ao meu grande amigo “irmão” Renato Nery Soriano (dá show!!!), Carlos Henrique Sarmento Lessa e mais um amigo “irmão” Leandro Batista Costa, que ganhei aqui em Piracicaba pela amizade incondicional e pelas alegrias.

Aos amigos da república: Leandro, Alberto (Tortuga), C-BA (Jean Sebastien), Caio e Fernando pelos momentos de felicidade e companheirismo.

Ao meu grande amigo conterrâneo Jose Mario Mamede Aguiar, o qual foi muito importante nos momentos que mais precisei e também ajudou bastante no desenvolvimento desta tese.

As amigas e colegas de laboratório: Tâmara Guindo Messias e Geórgia Pompeu, pela enorme ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a minha namorada Nádia Hortense Torres, que apesar de conhecê-la há pouco tempo, foi fundamental nesta etapa final de pesquisa e escrita da tese, e também pela paciência mostrada nos meus momentos de inquietação e ansiedade. Espero que sejamos muito felizes no decorrer de nossas vidas.

Ao grande amigo Rafael Dutra de Armas pelos diversos ensinamentos na colaboração da elaboração desta tese e pelas diversas dicas de trabalho e pela amizade.

Um agradecimento especial a Paula Fabiane, Xiua e Gicka pelos ensinamentos, paciência, companheirismo e o acompanhamento durante o desenvolvimento do projeto realizado no laboratório de Genética.

Aos amigos de Piracicaba C-ba, Ticiane, Rodrigo, Kinha, Bia, Valnei, Pisgui, Nay, Esmerê, Flipper pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos familiares e a todos os momentos que deixei de viver com vocês, ao amor que irrestritamente me dedicam, as suas orações e a Fé. Em especial a minha madrinha Hélia Cavalcante e José Bonifácio.

Aos meus irmãos queridos e que amo tanto, Fabiano Romanholo Ferreira, Gustavo Emílio Romanholo Ferreira e Túlio Henrique Romanholo Ferreira, os quais tenho tanto a seguir como referencial de vida os quais passamos momentos muito divertidos durante todo o nosso desenvolvimento juntos e também graças ao apoio moral e também financeiro. Serei eternamente grato.

Aos meus pais amados, Manoel Henrique Ferreira Neto e Ana Maria Romanholo Ferreira, que são exemplos de vida, caráter, humildade, amor e fé, que foram fundamentais nesta minha jornada de Pós Graduação.

E meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que tornaram de alguma forma possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
ABREVIATURAS	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Resíduos agroindustriais.....	27
2.2 Vinhaça.....	29
2.3 Fungos lignocelulolíticos.....	32
2.4 Basidiomicetos ligninolíticos	33
2.4.1 Fungos de degradação branca.....	35
2.4.2 Fungos de degradação marrom.....	37
2.4.3 Fungos de degradação branca.....	37
2.5 Enzimas lignocelulolíticas.....	38
2.6.1 Lacases.....	42
2.6.2 Manganês Peroxidase	45
2.7 Estresse oxidativo.....	46
2.7.1 Enzimas antioxidantes	47
2.8 Ecotoxicologia.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1 Microrganismos.....	55
3.2 Produção do inóculo “spawn” ou “semente-inóculo”	55
3.3 Condições de cultivo das linhagens.....	55
3.4 Produção de ligninases	56
3.5 Vinhaça de cana-de-açúcar.....	56
3.6 Seleção dos fungos para descoloração de vinhaça	56
3.7 Preparo do meio de cultivo contendo vinhaça.....	57
3.8 Estudo do crescimento sobre o resíduo	57
3.9 Produção de enzimas por <i>P. sajor-caju</i> CCB 020.....	57

3.10 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas	58
3.10.1 Reagentes	58
3.10.2 Atividade da enzima lacase (Lac)	59
3.10.3 Atividade da enzima Manganês Peroxidase (MnP)	59
3.10.4 Cálculo das atividades lignolíticas	60
3.11 Determinação da atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo.....	60
3.11.1 Extração de proteínas de <i>P. sajor-caju</i> CCB 020	60
3.11.2 Determinação das proteínas	61
3.11.3 Variações nos padrões protéicos	61
3.11.4 Atividades das enzimas antioxidantes.....	62
3.12 Toxicidade das amostras de vinhaça cultivada com <i>P. sajor-caju</i> CCB 020	65
3.13 Preparo e Manutenção dos organismos Testes	65
3.13.1 <i>Hydra attenuata</i>	65
3.13.2 <i>Daphnia magna</i> e <i>D. similis</i>	66
3.13.3 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	66
3.14 Testes de toxicidade	67
3.14.1 <i>Hydra attenuata</i>	68
3.14.2 <i>Daphnia magna</i> e <i>Daphnia similis</i>	69
3.14.3 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	69
3.15 Análise Estatística	70
3 RESULTADO E DISCUSSÃO	73
4.1 Seleção de linhagens pela produção de ligninases.....	73
4.2 Crescimento dos fungos sobre o resíduo.....	74
4.3 Cultivo submerso de <i>P. sajor-caju</i> em vinhaça enriquecida com nutrientes	79
4.4 Produção de enzimas lacases e Manganês peroxidase.....	81
4.6 Análise físico-química da vinhaça	87
4.5 Efeito da vinhaça 100% sobre a atividade de enzimas antioxidantes	90
4.5.1 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico.....	90
4.5.2 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante.....	92
4.5.3 Atividade de CAT em espectrofotômetro	94
4.5.4 Atividade de GR em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante.	95

4.6 Toxicidade de vinhaça 100% e vinhaça tratada com o fungo <i>P. sajor-caju</i> e análise de redundância (RDA).....	99
4.6.1 Toxicidade segundo o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber.....	99
4.6.2 Toxicidade da vinhaça pela análise de redundância (RDA).....	101
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
6 CONCLUSÃO.....	107
REFERÊNCIAS	109

RESUMO

Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana de açúcar por fungos

A vinhaça é um resíduo da produção de álcool após a fermentação do mosto e destilação do vinho, resultando de 10 a 15 litros para cada litro de etanol produzido. Este efluente altamente colorido é um sub-produto rico em nutrientes, principalmente matéria orgânica, tendo um alto potencial poluente quando disposto no ambiente. Os fungos ligninolíticos podem ser utilizados para a remediação de poluentes, como a vinhaça, pela ação de enzimas peroxidases. Foram utilizadas em ensaios para descoloração da vinhaça três linhagens de fungos ascomicetos e cinco de basidiomicetos sendo que o basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 se destacou dos demais. A descoloração foi concomitante com o aumento das atividades de lacase e manganês peroxidase. Entretanto ficou evidente que a lacase é a enzima de maior importância na descoloração. *P. sajor-caju* é comestível tendo seus valores nutricionais determinados na literatura. A vinhaça desencadeou o processo de estresse oxidativo no fungo, fato observado através da elevação da atividade de enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutatona redutase) associadas a mecanismos de detoxificação de espécies ativas de oxigênio. Quando comparado com crescimento em meio sintético, o cultivo submerso de *P. sajor-caju* em vinhaça demonstrou aumento na produção de biomassa ($1,06 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$), e aumento na atividade das enzimas como a lacase (variando entre 400 e 450 UI L^{-1}) alcançada entre o 9º e 10º dia e para MnP alcançada no 12º dia de cultivo (variando de 60 a 100 UI L^{-1}), a 28°C , com agitação constante. Nos mesmos tratamentos foram observadas reduções de: 82,76% na DQO, de 75,29% da DBO, da coloração em 99,17% e da turbidez em 99,73%, indicando a participação destas enzimas na despolimerização de compostos fenólicos e pigmentos de melanoidinas. Após 15 dias de tratamento com o fungo, foi evidenciada a redução de toxicidade da vinhaça determinada por exposição aos organismos: *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*. Foi concluído que o uso do sistema vinhaça e *P. sajor-caju* pode ser aplicado em bioprocessos de remoção de cor e na degradação de compostos complexos da vinhaça, ocorrendo destoxicação e melhora em suas qualidades podendo ser indicada como água de reuso, produção de enzimas lacases e manganês peroxidase e aproveitamento de biomassa.

Palavras-chave: Degradação; Descoloração; Enzimas; Fungos ligninolíticos; Estresse oxidativo; Bioensaios

ABSTRACT

Fungi biodegradation of vinasse from industrial sugarcane processing

Vinasse is a residue resulting from the production of alcohol after pulp fermentation and distillation of the wine, ensuing from 10 to 15 liters for each liter of ethanol produced. This high colored effluent is a by-product rich in nutrients, mainly organic matter, having a high pollutant potential when disposed in the environment. Lignolytic fungi can be utilized in the remediation of pollutants, such as vinasse, by the action of peroxidases. Assays for the decolorization of vinasse by three ascomycetes fungi and five basidiomycetes were performed and consequently selecting the fungus *Pleurotus sajor-caju* CCB 020. The activities of manganese-dependent peroxidases (MnP) and laccases and the quantification of the decolorization after the treatment of the vinasse by *P. sajor-caju* were evaluated and it was observed that this fungus can be utilized to biodegrade and decolorize the vinasse at a concentration of 100% without the necessity of dilution. *P. sajor-caju* is an edible fungus with nutritional values determined in the literature. The vinasse triggered the process of oxidative stress in the fungus, fact observed through the elevation of the enzyme activities (superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase) associated to mechanisms of detoxifying reactive oxygen species. When compared to the growth in synthetic medium, the tests in submerged vinasse cultivation with *P. sajor-caju* demonstrated a raise in the biomass production ($1,06 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$), and in the enzyme activities such as laccase (varying from 400 to 450 U L^{-1}) reached between the 9th and 10th day of growth and for MnP at the 12th day of cultivation (varying from 60 a 100 U L^{-1}), indicating the participation of these enzymes in the depolymerization of phenolic compounds and melanoidins pigments. In the same treatments were observed reductions of 82,76% in COD, 75% of BOD, 99,17% in the color and 99,73% for the turbidity. After the treatment with the fungus, a reduction in the toxicity was evident through the exposition of *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Daphnia similis* e *Hydra attenuata*. It was concluded that the system *P.sajor caju*/vinasse can be utilized as a bioprocess for color removal and degradation of complex molecules. It was observed an improvement in the characteristics and detoxification allowing it to be utilized as reused water, laccase and manganese peroxidase enzymes production and for fungal biomass production with a high nutritional value.

Keywords: Degradation; Descolorization; Enzyme; Ligninolytic fungi; Oxidative stress; Bioassays

ABREVIATURAS

E.C. = *Enzyme Committee* (classificação bioquímica de enzimas)

CCB = Coleção de Cultura de Basidiomicetos (Instituto de Botânica (IBt) de São Paulo)

UI = Unidade Internacional

Ø = diâmetro

LAC = lacase

MnP = Manganês peroxidase ou peroxidase dependente do manganês

LiP = Lignina Peroxidase

CAT = catalase

ABTS = 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)

EAOs = espécies ativas de oxigênio

GR = glutathiona redutase

GSH = glutathiona reduzida

GSSG = glutathiona oxidada

EAOs = espécies ativas de oxigênio

SOD = superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica de melanoidina.....	31
Figura 2 – Sistema de enzimas ligninolíticas pertencentes ao grupo das oxiredutases provenientes de fungos basidiomicetos	39
Figura 3 – Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de <i>H. attenuata</i>	69
Figura 4 – Desenvolvimento de halo avermelhado em meio contendo guaiacol	73
Figura 5 – Porcentagem de descoloração de vinhaça 100% por fungos basidiomicetos e ascomicetos após 12 dias de incubação	77
Figura 6 – Descoloração da vinhaça por <i>P. sajor-caju</i> CCB 020.....	78
Figura 7 – Produção de biomassa por <i>P. sajor-caju</i> após 12 dias de cultivo	80
Figura 8 – Atividade de lacase por <i>P. sajor-caju</i> durante 15 dias de cultivo	81
Figura 9 – Atividade de MnP por <i>P. sajor-caju</i> durante 15 dias de cultivo	82
Figura 10 – Descoloração da vinhaça por <i>P. sajor-caju</i> durante 15 dias de cultivo	83
Figura 11 – Redução da Turbidez (NTU) da vinhaça por <i>P. sajor-caju</i>	84
Figura 12 – Relação entre a atividade de lacase, manganês peroxidase, descoloração e produção de biomassa sobre o resíduo de vinhaça (100%) durante 15 dias de cultivo com <i>P. sajor-caju</i>	86

Figura 13 – Turbidez e descoloração da vinhaça 100% tratada com <i>P. sajor-caju</i>	87
Figura 14 – Análise da demanda química de oxigênio e demanda bioquímica de oxigênio após tratamento da vinhaça 100% com o fungo <i>P. sajor-caju</i>	88
Figura 15 – Quantificação de proteínas solúveis (mg mL^{-1}) extraída do micélio mostrando o efeito do crescimento do fungo <i>P. sajor-caju</i> 020 no período de 6,9 e 12 dias no meio controle (C) (MSF) e em vinhaça (V) 100%	91
Figura 16 – Proteína em gel SDS-PAGE	92
Figura 17 – Atividade da enzima SOD em PAGE não-desnaturante	93
Figura 18 – Atividade em espectrofotômetro de catalase	94
Figura 19 – Atividade em espectrofotômetro de glutathiona redutase	97
Figura 20 – Gel de atividade da enzima GR em PAGE não-desnaturante	97
Figura 21 – Análise de redundância (RDA) com os organismos <i>H. attenuata</i> , <i>P. subcapitata</i> , <i>D. magna</i> e <i>D. similis</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Processo bioquímico para determinação de SOD	63
Tabela 2 – Soluções-estoque para manutenção da cultura de <i>P. subcapitata</i>	67
Tabela 3 – Efeito da concentração de vinhaça sobre o crescimento dos fungos	75
Tabela 4 – Caracterização do resíduo de vinhaça 100% e vinhaça tratada	89
Tabela 5 – Valores de CI_{50} para <i>P.subcapitata</i> , CE_{50} e CL_{50} para <i>H. attenuata</i> e CL_{50} para <i>D. magna</i> e <i>D. similis</i>	101

1 INTRODUÇÃO

O tradicional processo industrial, além do produto de interesse, gera múltiplas saídas de outros materiais em forma de resíduos e emissões não incorporadas no produto final que, geralmente, são aceitas como efeito normal no processo de fabricação. Porém, nos últimos anos têm se intensificado o aproveitamento de resíduos, especialmente os agroindustriais tais como, resíduos de frutas, bagaço de mandioca, farelo de soja, bagaço de cana de açúcar, vinhaça, etc. Vários processos biotecnológicos foram desenvolvidos para utilizar esses materiais na produção de álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e fungos, gerando produtos de grande valor econômico. Este pensamento atende a proposta ZERI, “*Zero Emissions Research Initiative*”, que estabelece uma mudança de paradigmas no conjunto das atividades econômicas, particularmente dos processos de produção industrial. A estratégia da proposta ZERI, objetiva a transformação da matéria-prima em bens úteis sem danificar o meio ambiente, colocando os resíduos e emissões como insumos para outros produtos (ISRAEL, 2005).

A indústria sucroalcooleira é uma excelente representação do processo de desenvolvimento do Brasil, tendo a cana-de-açúcar como uma das maiores monoculturas de acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2006).

Na safra 2007/2008, o Brasil produziu 31 milhões de toneladas de açúcar, sendo que dois terços desse total foram destinados à exportação, número que corresponde a mais de 65% das vendas no mercado internacional. A expectativa para a safra 2015/16 é que esse número atinja 41,3 milhões de toneladas. Nesta safra (2007/2008) o Brasil produziu 22,5 bilhões de etanol e para a safra 2015/16, a estimativa é de uma produção em torno de 46,9 bilhões (CONAB, 2009).

Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias sucroalcooleiras é o grande volume de resíduos gerados, em especial a vinhaça. Esta por sua vez, apresenta alto poder poluente para os corpos hídricos e alto valor fertilizante para solos. É constituída principalmente de água e sais sólidos em suspensão ou solúveis, sendo que o teor de água está entre 94 a 96%. Comparada aos outros resíduos orgânicos produzidos pela indústria sucroalcooleira, a vinhaça é a que mais contém nutrientes em sua composição, predominando o potássio seguido de cálcio, magnésio, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico (WADT, 2008).

A vinhaça, resíduo proveniente da produção do álcool, após a fermentação do mosto e destilação do vinho, apresenta coloração e riqueza em nutrientes (KUMAR et al., 1998). Devido sua composição ser, principalmente matéria orgânica, apresenta alto potencial poluente quando

disposta nos corpos hídricos. A ampliação da aplicação da vinhaça em fertirrigação vem dando bons resultados ao longo dos anos (ARAFAT; YASSEN, 1991; FREIRE; CORTEZ, 2000; LEITE, 1999), entretanto normas ambientais cada vez mais rígidas, especialmente no estado de São Paulo, têm colocado pressão nos produtores tradicionais de açúcar e álcool a partir da cana-de-açúcar, o que leva a necessidade de criação de novos tratamentos e novos usos para os resíduos. Este produto residual possui capacidade de agregar valor a produção dependendo do setor em que é empregado.

Em função de sua natureza, os efluentes industriais lançados ao meio ambiente provocam diferentes impactos causados pelo aumento de sólidos em suspensão, carga iônica, toxicidade, cor e odor. A cor, poucas vezes é considerada uma forma de contaminação, apesar dos danos que provoca, podendo estar associado a presença de compostos tóxicos e grupos cromóforos, ou polímeros de alto peso molecular como a lignina. Durante o tratamento de um resíduo apresentando cor, deve-se prestar atenção a redução ou eliminação da cor, contribuindo desta forma a reduzir o impacto sobre os ecossistemas onde são lançados (RODRÍGUEZ et al., 2003).

Dando aporte a esta proposta, os processos biotecnológicos vêm sendo amplamente considerados como uma alternativa consistente para a geração de bens e serviços, pois uma das formas de transformar os resíduos gerados em produtos úteis, muitas vezes para a indústria que o produz, consiste em utilizar o seu próprio potencial de reação por meio de bioprocessos.

Dentro deste contexto, os fungos desempenham importante papel no processo de bioconservação, pois podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizarem a poluição através da redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), formar produtos de interesse às indústrias de alimentos, papel, fármacos, enzimas de interesse ambiental, entre outros. A partir da década de 80 foi proposto o emprego de fungos de decomposição branca, como alternativa para realizar a descoloração de efluentes (RODRÍGUEZ et al., 1999). A aceitação crescente destes organismos em processos de tratamento e/ou biorremediação se deve aos fungos da decomposição branca apresentarem um sistema enzimático extracelular de caráter não-específico e, capaz de romper uma grande quantidade de ligações químicas diferentes (HIGSON, 1991; EGGEN, 2000).

Portanto, considerando a importância deste assunto no âmbito da tecnologia ambiental, este trabalho tem por objetivo principal a seleção de fungos basidiomicetos e ascomicetos utilizando vinhaça como substrato para o crescimento. Outrossim, selecionar uma linhagem

visando à obtenção de enzimas lignocelulolíticas, tais como a lacase (Lac) (EC 1.10.3.2) e a manganês peroxidase (MnP) (EC 1.11.1.13), bem como avaliar a toxicidade por meio de bioensaios, antes e após o tratamento com o fungo e o processo de estresse oxidativo causado pelo resíduo durante o crescimento do fungo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos agroindustriais

As atividades agroindustriais no Brasil evoluíram, rapidamente, na safra 2002/03. Neste período é estabelecido mais um recorde, com 120 milhões de toneladas de produtos vindos da agroindústria (ISRAEL, 2005). Porém o estudo dos impactos causados por este setor sobre o meio ambiente é pouco abrangente no sentido de que é restrita, normalmente, à unidade fabril, deixando de lado outros aspectos importantes e intrínsecos às atividades agroindustriais, necessitando da implantação de um completo planejamento ambiental dessas atividades e das demais que lhe são suportes ou as complementam (SALLES, 1993).

Segundo Abarca (1999), o setor agroindustrial não é reconhecido pela sociedade como um setor que afeta o meio ambiente. De acordo com este autor talvez tal fato seja devido à sociedade valorizar mais a contribuição da atividade agroindustrial na produção de alimentos sendo, entretanto, desconhecido, para a maior parte dela, a complexidade dos processos tecnológicos existentes neste tipo de atividade, bem como o montante de subprodutos poluidores que são gerados e depositados no meio ambiente.

Segundo a União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA), a safra de 2007/2008 produziu até essa data, aproximadamente 22,5 bilhões de litros de etanol. Com a tecnologia de hoje, todos os automóveis equipados com catalisadores, podem funcionar com uma mistura de 90% gasolina e 10% álcool sem precisar modificações no motor. No Brasil, o etanol puro é utilizado como alternativa ao combustível fóssil. E qualquer país com uma economia baseada na agricultura pode usufruir da tecnologia para a fermentação de etanol. Segundo levantamento feito pela União dos produtores de Bioenergia (UDOP, 2008), os Estados Unidos registrou um aumento na produção de etanol de milho alcançando 614 mil barris diários enquanto a Europa produz aproximadamente 2 bilhões de litros de etanol a partir de beterraba.

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, sendo, na sua maioria, biomassa lignocelulósica, representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser biologicamente convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional (KEREM et al.,1992). Segundo Doelle (1996) uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir de materiais lignocelulósicos resultando em múltiplos produtos, sem efluentes poluentes no solo, na água e no ar, é caracterizada como uma “tecnologia integrada”. De acordo com Sermanni e Porri

(1989) a utilização de material lignocelulósico para a obtenção de compostos de alto valor econômico, por biotransformação, é um dos mais interessantes campos da pesquisa biotecnológica.

No que se refere à biotecnologia ambiental, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de se obter um produto a partir de um resíduo gerado na agroindústria. Como exemplos, citam-se a produção de cogumelos comestíveis em resíduos lignocelulósicos (TONINI, 2004; WADT, 2008), antibióticos (VIEIRA, 2005) e outros metabólitos a partir de fungos Basidiomicetos.

Devido o aumento da demanda energética no mundo, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm atraído a atenção de todos. Por esse motivo, os materiais de origem lignocelulolítica provenientes de atividades agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, têm sido aproveitados visando à utilização nos processos para renovação energética. Devido esses materiais serem ricos em sacarídeos, alguns muito complexos, a conversão dessas moléculas é vista como a alternativa mais viável na substituição dos combustíveis fósseis. Com isso intensos estudos estão sendo realizados para entender o complicado processo de degradação desses compostos a fim de serem utilizados para fins práticos (AGUIAR FILHO, 2008).

Os componentes principais dos materiais lignocelulolíticos são a celulose, hemicelulose e lignina. As paredes das células das plantas são compostas por diferentes camadas, que diferem uma da outra em respeito à estrutura e a composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto que é formado por substâncias estruturais (hemiceluloses) e envoltórias (lignina). Essas substâncias estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FENGEL; WEGENER, 1989). É entendido que as moléculas de hemicelulose estão quase paralelas às fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se em uma forma aleatória, conferindo maior estabilidade à parede.

Uma grande variedade de fungos e bactérias consegue degradar esse material lignocelulósico usando uma bateria de enzimas hidrolíticas e oxidativas (VITTI, 1988). A celulose e a hemicelulose podem ser hidrolizadas formando açúcares que são posteriormente convertidos quimicamente ou por microrganismos, em etanol ou butanol, ou também em vários outros produtos como: acetona, ácidos orgânicos, ou glicerol (WYMAN, 2003).

Basicamente, dois grupos de enzimas são responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês-peroxidase e

lignina-peroxidase, atuam na degradação da lignina e destoxificam o meio de crescimento transformando os metabólitos gerados. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (KAMIDA, 2005).

2.2 Vinhaça

Todos os líquidos susceptíveis a sofrer uma fermentação são denominados mostos. Uma vez fermentado o mosto de cana, passa a chamar-se vinho, ou vinhoto, no qual pode ser destilado possibilitando a recuperação de álcool, restando um resíduo que é a vinhaça. O resíduo apresenta característica ácida (pH 4,0 a 4,8), de cor escura com alta DBO (42.000-100.000 mg L⁻¹) e DQO (10.000-210.000 mg L⁻¹) e emite um cheiro forte característico, que vai do adstringente ao nauseabundo (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A vinhaça é considerada um resíduo da indústria sucroalcooleira. Aproximadamente de 10 a 18 litros de vinhaça é obtido por 1 litro de álcool produzido e sua composição varia de acordo com a matéria prima e dos equipamentos utilizados no processo de obtenção do álcool (KUMAR et al., 1998; WADT, 2008). Ela vem sendo empregada no setor agrícola como fertilizante principalmente nos cultivos de cana-de-açúcar. A vinhaça pode promover melhoria na fertilidade do solo, no entanto as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, ou seja, as dosagens dependem de acordo com as características do solo. Quando usada em proporções desbalanceadas, acarretam na lixiviação de vários desses íons, sobretudo nitrato e potássio (SILVA, 2007).

Sua aplicação é realizada de diversas formas: por caminhões tanques, por sulcos de infiltração, por aspersão e atualmente existe a possibilidade da dispersão da vinhaça diluída por meio de pivôs centrais (UNICA, 2008).

Segundo Silva (2006), alguns efeitos da vinhaça no solo são: elevação do pH, aumento da disponibilidade de alguns íons, aumento da capacidade de troca catiônica, promove o aumento da retenção de água e melhora a estrutura física do solo. Esse resíduo também deve ser visto como um agente de aumento na população e na atividade microbiana do solo. Enquanto a matéria orgânica contida na vinhaça é introduzida no solo, ela é metabolizada por fungos, que assim neutralizam a

acidez, permitindo a proliferação bacteriana, responsável pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. A neutralização da acidez do solo também proporciona o aumento de outros microrganismos participantes de ciclos biogeoquímicos de outros elementos (LEITE, 1999).

A grande preocupação da vinhaça advém basicamente de sua decomposição química, da quantidade na qual é gerada, na qual a torna um grande poluidor (MACHADO, 1998). É caracterizada por ser um resíduo com um alto conteúdo de matéria orgânica, elementos minerais (K, Ca e Mg), baixo pH, cor marrom-escura devido à presença de polímeros de alto peso molecular chamados melanoidinas (Figura 1), que são formados pela reação de Maillard e compostos fenólicos (ácido tânico e húmico). Estas substâncias são frequentemente tóxicas para os microrganismos propícios aos biotratamentos de efluentes e altamente recalcitrantes, ou seja, persistem no solo, e possuem propriedades antioxidantes (MIGO et al., 1993; PÉREZ et al., 2006; MOHANA et al., 2008; NAIK, 2008).

Até o final da década de 70, volumes crescentes de vinhaça eram lançados nos mananciais superficiais, principalmente nos cursos d' água como rios e ribeirões nas proximidades das usinas. Quando essa prática foi proibida, os efeitos decorrentes já eram grandes (VIANA, 2006). A carga orgânica da vinhaça causa a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, assim impedindo a sobrevivência da flora e fauna aquática e dificultando o aproveitamento desses mananciais.

Com o aumento substancial da produção de etanol no Brasil, existe também um aumento na necessidade do controle desse resíduo. Diversas tecnologias estão surgindo para o reaproveitamento e/ou tratamento da vinhaça uma vez que esse composto apresenta um grande potencial poluidor na natureza (MANE, 2006; SILVA, 2007).

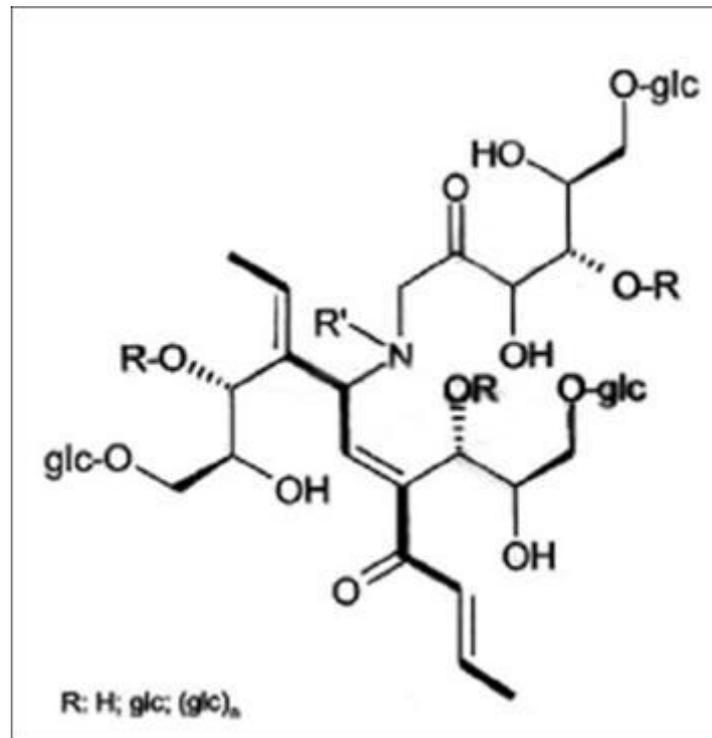


Figura 1- Estrutura básica de melanoidina. Fonte: Naik, N. M.; Jagadeesh, K.S.; Alagawadi, A.R (2008)

Atualmente, a utilização de álcool como combustível alternativo em veículos automotores em substituição à gasolina, acarretou um aumento na produção de vinhaça. A nova legislação da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB (Norma Técnica 4.231, março 2005) restringiu o uso da vinhaça em fertirrigação com base no teor de potássio, mineral abundante na vinhaça, limitando sua aplicação.

Desde 1986, existe uma série de pesquisas sendo desenvolvidas no país a fim de agregar valor aos produtos e subprodutos da agricultura, principalmente pelo aumento da geração de resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos da agroindústria brasileira, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para a fermentação, também ajuda nos problemas de poluição (PANDEY et al., 2000).

O setor sucroalcooleiro brasileiro tem realizado esforços para resolver o problema da disposição da vinhaça produzida. Com o aumento da tecnologia e da preocupação ambiental, vários processos vêm sendo desenvolvidos a fim de conferir à vinhaça uma utilização nobre, enfatizando o aproveitamento de suas potencialidades orgânicas e minerais, e, sobretudo, redução de seu volume e eliminação do seu teor poluente (PRADA et al., 1998).

Uma forma de reaproveitamento da vinhaça que é submetida ao processo de biodegradação é a sua utilização no reuso da água para os processos de lavagem da cana, irrigação da cultura e outras atividades intrínsecas ao processo industrial, bem como para a produção de metabólitos de interesse comercial. Por outro lado, reduz-se a contaminação de solos e corpos hídricos principalmente pelo seu armazenamento em zonas de sacrifício em regiões que apresentem lençol freático próximo a superfície (FREIRE; CORTEZ, 2000).

2.3 Fungos lignocelulolíticos

Os fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. Eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (DUPONT et al., 1997).

Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulíticos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, como a avicelase, carboximetilcelulase e β -glicosidase (Celulases), enzimas que atuam sobre a porção celulósica. As xilanases, mananases, glucanases e galactanases (Hemicelulases) atuam sobre a porção hemicelulósica e as enzimas oxidativas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (KEREM et al., 1992; TUOR et al., 1995; WOOD; GARCIA-CAMPAYO, 1990).

Muitas são as evidências de que os mecanismos que atuam na regulação do sistema ligninolítico dos basidiomicetos são os mesmos que atuam na degradação dos xenobióticos e, portanto podem ser também estimulados pela variação das condições de cultivo dos fungos. A capacidade de degradação de diferentes classes de xenobióticos por basidiomicetos ligninolíticos está associada à natureza inespecífica do sistema enzimático ligninolítico e permite que até mesmo misturas complexas de poluentes sejam degradadas (BARR; AUST, 1994; BALAN; MONTEIRO, 2001).

A degradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos constitui um processo oxidativo, extracelular e relativamente inespecífico. A degradação consiste em um processo multienzimático resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das oxidoreduases, representadas principalmente por lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio e de compostos metabólitos intermediários de baixa massa molecular (KIRK; FARRELL, 1987, VARES et al., 1995, LEONOWICZ et al., 1999, MAYER; STAPLES, 2002, SUGIURA et al., 2003).

Os fungos são reconhecidos por sua habilidade em produzir uma ampla variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos, além da sua capacidade para se adaptar a vários contaminantes ambientais (COULIBALY et al., 2003). As atenções têm sido direcionadas para a utilização da atividade microbiana para a descoloração de resíduos agroindustriais. Vários artigos indicam que alguns fungos em particular têm este potencial para descoloração (KUMAR et al., 1998).

A atividade das enzimas ligninolíticas produzidas por estes fungos podem ser determinadas através de espectrofotometria UV/VIS, em reação onde se acompanha a formação de produto oxidado pela enzima. Os resultados são expressos pela Lei de Lambert-Beer em unidades enzimáticas (U), onde 1U é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de produto por minuto sob condições definidas. Os substratos enzimáticos mais utilizados para a determinação das atividades de lacases, lignina peroxidases (LiP) e manganês peroxidases (MnP) são o ABTS, a siringaldazina, o álcool veratrílico e o vermelho de fenol, respectivamente (KUWAHARA et al., 1984; TIEN; KIRK, 1984; BOURBONNAIS; PAICE, 1988). Estes métodos são simples, versáteis, muito sensíveis e de baixo custo.

2.4 Basidiomicetos ligninolíticos

O grupo dos basidiomicetos inclui os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, que por sua vez é formado por muitos filamentos septados chamados hifas. O septo das hifas pode ser simples ou possuir ansas, que é uma estrutura característica do grupo e são conhecidos como septo

dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam. Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistosporos, que são liberados violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos, que são liberados passivamente (GUGLIOTTA; CAPELARI, 1998).

O sistema ligninolítico responsável pela biodegradação da lignina é o mesmo envolvido na degradação de poluentes orgânicos por basidiomicetos ligninolíticos e apresenta algumas vantagens de aplicação na biorremediação de solos. Este sistema é extracelular, pode atuar em substâncias insolúveis ou complexadas ao solo. A inespecificidade do sistema enzimático permite a sua utilização para uma ampla variedade de poluentes orgânicos. Além disso, o sistema não precisa ser induzido e a degradação pode ocorrer até níveis não detectáveis, com mineralização (BARR; AUST, 1994). Devido à baixa especificidade e elevado potencial de oxidação do sistema enzimático, os basidiomicetos ligninolíticos são também capazes de degradar uma variedade de compostos recalcitrantes (FRAGOEIRO; MAGAN, 2005).

Muitos xenobióticos podem permanecer por longo tempo na natureza, e devido ao potencial das enzimas ligninolíticas produzidas por basidiomicetos, o interesse na aplicação destes fungos na biorremediação de solos contaminados vem aumentando nos últimos anos. Diversos estudos demonstraram que *Phanerochaete chrysosporium*, espécie referência nos estudos de biodegradação de poluentes orgânicos, degrada diferentes tipos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Bumpus (1993;1995) demonstrou que este fungo foi capaz de degradar 22 tipos de HPAs, promovendo a remoção de 70-100% destes compostos em 27 dias. Outros estudos demonstraram que lignina peroxidase produzida por *P. chrysosporium* oxidou benzo(a)pireno, antraceno, pireno, perileno, *p*-cresol, pentaclorofenol e fenol por meio de mecanismos parecidos com os observados na degradação da lignina e seus derivados (BARR; AUST 1994; REDDY 1993).

Novotny et al. (1999) descreveram que *Pleurotus ostreatus* foi uma espécie conveniente para a aplicação na biorremediação de solos contaminados com poluentes recalcitrantes porque este fungo apresentou um crescimento denso e eficiente produção de enzimas ligninolíticas extracelulares em solo, até mesmo na presença de concentrações relativamente altas de HPAs. Tal crescimento micelial denso em solo contaminado e a eficiente expressão de enzimas ligninolíticas são pré-requisitos para uma boa capacidade do fungo para remoção das moléculas poluentes no solo. As taxas de degradação de HPAs observadas com *P. ostreatus* em solo contaminado foram

significativamente maiores que as encontradas em culturas com *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor*, especialmente no caso de antraceno e pireno (JÖNSSON et al., 1998).

Muitas moléculas xenobióticas, como corantes têxteis e organoclorados, têm sido degradadas por basidiomicetos isolados de ecossistemas brasileiros. Tais linhagens de fungos envolvidas na degradação destas moléculas incluem as espécies: *Higrocybe* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophora cinerea*, *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Psilocybe castanella*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (BALAN; MONTEIRO, 2001; GUGLIOTTA, 2001; MATHEUS et al., 2001; MACHADO et al., 2005a, MACHADO et al., 2005b; DELLAMATRICE, 2005; DELLAMATRICE et al., 2005; KAMIDA et al., 2005; MOREIRA NETO, 2006).

Os basidiomicetos ligninolíticos secretam enzimas que convertem os polímeros externos em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. A secreção de proteínas parece ocorrer durante o crescimento apical das hifas, sendo liberadas pela parede celular recém sintetizada (WESSELS, 1994). Os fungos decompositores da madeira podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: fungos de degradação (podridão) branca, de degradação (podridão) marrom ou parda e de degradação (podridão) branda ou macia (mole) (MELO, 2008). Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos ligninolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al., 2000). Além disso, estes organismos parecem ser os únicos capazes de mineralizar a molécula de lignina presente na madeira (KIRK; FARRELL, 1987; LEONOWICZ et al., 1999; SHAN; NERUD, 2002).

2.4.1 Fungos de degradação branca

A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação, sendo os fungos de decomposição branca um dos grupos que tem obtido maior notoriedade em estudos relacionados a esta área (CHANDRA; RUSTGI, 1998). Os fungos de podridão branca, ou seja, os degradadores de lignina têm obtido crescente êxito em pesquisas relacionadas à biodegradação de poluentes, pois estes são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (CLEMENTE, 2002).

Os basidiomicetos responsáveis pela degradação branca da madeira selecionam a lignina presente na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta, mas variam consideravelmente com o tipo de ataque à lignina, com os polissacarídeos da madeira e a velocidade com o qual atuam na remoção da lignina (KIRK, 1998).

Esses fungos são classificados, dessa maneira, por características morfológicas e fisiológicas das hifas. A maioria tem hifas dicarióticas com conexões específicas entre os septos do micélio (MELO, 2008). Esses basidiomicetos oxidam compostos fenólicos, relacionados à lignina, que está principalmente associada a enzimas extracelulares lignocelulolíticas (KIRK et al., 1986; JØRGENSEN, 2005).

Há várias espécies de fungos da degradação branca da madeira, sendo a maioria deles os basidiomicetos ligninolíticos, além de alguns ascomicetos. Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca ou basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira dura (*hardwood*) ou madeira mole (*softwood*), enquanto os ascomicetos provavelmente degradam unicamente madeira dura. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é unicamente lignina, mas também hemiceluloses e celulose (KIRK; FARRELL, 1987; TUOMELA et al., 2000).

Basidiomicetos de degradação branca como *Pleurotus* spp., são caracterizados pela habilidade de degradar os polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina é um polímero aromático da parede celular vegetal que proporciona a célula rigidez, impermeabilidade, resistência microbiana e possuem uma biodegradabilidade restrita. Com isso o ataque inicial do fungo precisa ser extracelular, não-específico e oxidativo (KIRK et al., 1986; KLYOSOV, 1990). Essa biodegradação lignolítica envolve a ação de enzimas como lignina peroxidase, manganês-peroxidase, peroxidases e lacases (ERIKSSON, 1990; KIRK et al., 1986; HATAKKA, 1994; LEE, 2003; FERRAZ, 2004; JØRGENSEN, 2005). Os fungos do gênero *Pleurotus* produzem MnP, peroxidases, lacases, mas não produzem ligninas peroxidases (COHEN, 2002). Nos anos mais recentes análises mais enfáticas estão sendo na MnP, porque essa enzima é produzida pela maioria dos fungos de degradação branca.

Os fungos desse gênero são também são biologicamente versáteis quando a biodegradação de materiais contaminantes. Foi descoberto que o fungo *P. ostreatus* é capaz de degradar e

mineralizar compostos xenobióticos, como PAHs, corantes industriais e outros poluentes de solo, como a atrazina (MENEZES, 1997; CLEMENTE, 2002; DELLAMATRICE *et al.*, 2005).

2.4.2 Fungos de degradação marrom

Durante a biodegradação da madeira os fungos da podridão parda degradam extensamente celuloses e hemiceluloses, mas a degradação da lignina é limitada. A lignina é quimicamente modificada por desmetilação de suas unidades fenólicas e não fenólicas e também pode ocorrer limitada hidroxilação do anel aromático da lignina. Estes resíduos produzidos pela modificação da lignina contribuem para formação do húmus. Com essa característica, o material restante desse processo tem uma coloração amarronzada e de aparência frágil (LEE, 2003). Os fungos da podridão parda, que representam somente 6% da classe Basidiomicotina degradadores de madeira, são capazes de mineralizar grupos metoxil da lignina, mas a mineralização de outras partes é muito menor quando comparado aos fungos da podridão branca (TIEN, 1984; KIRK; FARRELL, 1987; DURÁN; ESPOSITO, 1997; FUJIAN *et al.*, 2001; LEE, 2003).

As células da parede da madeira são atacadas por esses fungos formando poros e erosões, devido à quebra das microfibrilas da celulose. Devido a esse mecanismo, as hifas dos fungos de degradação marrom pode se dividir em duas categorias: as que degradam os componentes da parede celular da madeira, incluindo a lignina e as que somente modificam a lignina enquanto degradam a celulose e/ou hemicelulose (LEE, 2003; AZEVEDO, 2008).

2.4.3 Fungos de degradação branca

Geralmente pertencentes às classes Ascomicotina e Deuteromicotina, esses fungos podem causar degradação na madeira em uma forma suave, de aparência úmida (JØRGENSEN, 2005). Essa degradação ocorre pela penetração fina das hifas fúngicas nas camadas da parede celular.

Os fungos da podridão mole da madeira e alguns actinomicetos e mixomicetos fazem parte do processo de sucessão da decomposição da madeira em ecossistemas florestais, embora a taxa de degradação dos constituintes da madeira seja relativamente menor. Os fungos da podridão mole são ascomicetos e fungos anamorfos que participam da degradação da madeira na natureza. Todos os componentes da madeira são degradados, mas as taxas de degradação são mínimas quando comparadas aos fungos da podridão branca e parda. Este grupo de fungos está associado

em parte à decomposição da serapilheira em ecossistemas florestais, geralmente em ambientes mais úmidos. Fenóis e ácido vanílico são rapidamente degradados por fungos da podridão mole. Há também muitas espécies de actinomicetos e mixomicetos que degradam a lignina. Os actinomicetos podem solubilizar e modificar extensamente a estrutura da lignina, mas sua capacidade de mineralização é limitada. Várias espécies de bactérias como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Streptomyces* degradam compostos aromáticos mais simples. Estas bactérias geralmente atuam em ambientes quase anaeróbios, consumindo principalmente metabólitos intermediários de baixa massa molecular produzidos pelos fungos (TUOMELA et al., 2000; NETO, 2006).

Os fungos de degradação branda colonizam e degradam madeiras duras, de alta umidade, mas também degradam madeiras moles porém com uma taxa de hidrólise mais lenta quando comparada com fungos de degradação branca e marrom. Esses fungos são mais eficientes na despolimerização de compostos sintéticos de lignina (AZEVEDO, 2008).

2.5 Enzimas lignocelulolíticas

Os basidiomicetos ligninolíticos produzem vários tipos de enzimas pertencentes ao grupo das oxidoreduções (Figura 2). Produzem peroxidases contendo grupo heme: lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13) e outras peroxidases com ampla atuação. Produzem flavina oxidases: glicose oxidases (EC 1.1.3.4), piranose-2-oxidases (EC 1.1.3.10), metanol oxidases (EC 1.1.3.13) e aril álcool oxidases (AAO; EC 1.1.3.7), que reduzem oxigênio dissolvido à peróxido de hidrogênio, com simultânea oxidação de hidroxilas de substratos específicos à carbonilas. Produzem ainda celobiose desidrogenases (CDH; EC 1.1.99.18) que são flavohemeproteínas que reduzem radicais fenoxi e radicais catiônicos, íons de ferro ou quinonas e simultaneamente oxidam celobiose à celobionolactona. Outro grupo de enzimas são as oxidases que contém cobre, como as lacases (EC 1.10.3.2), que reduzem oxigênio dissolvido à água, com oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, formando radicais catiônicos, quinonas ou radicais fenoxi, além das glioxal oxidases e galactose oxidases (EC 1.1.3.9), que reduzem oxigênio à peróxido de hidrogênio, com oxidação de um álcool ou aldeído específico (SHAN; NERUD, 2002).

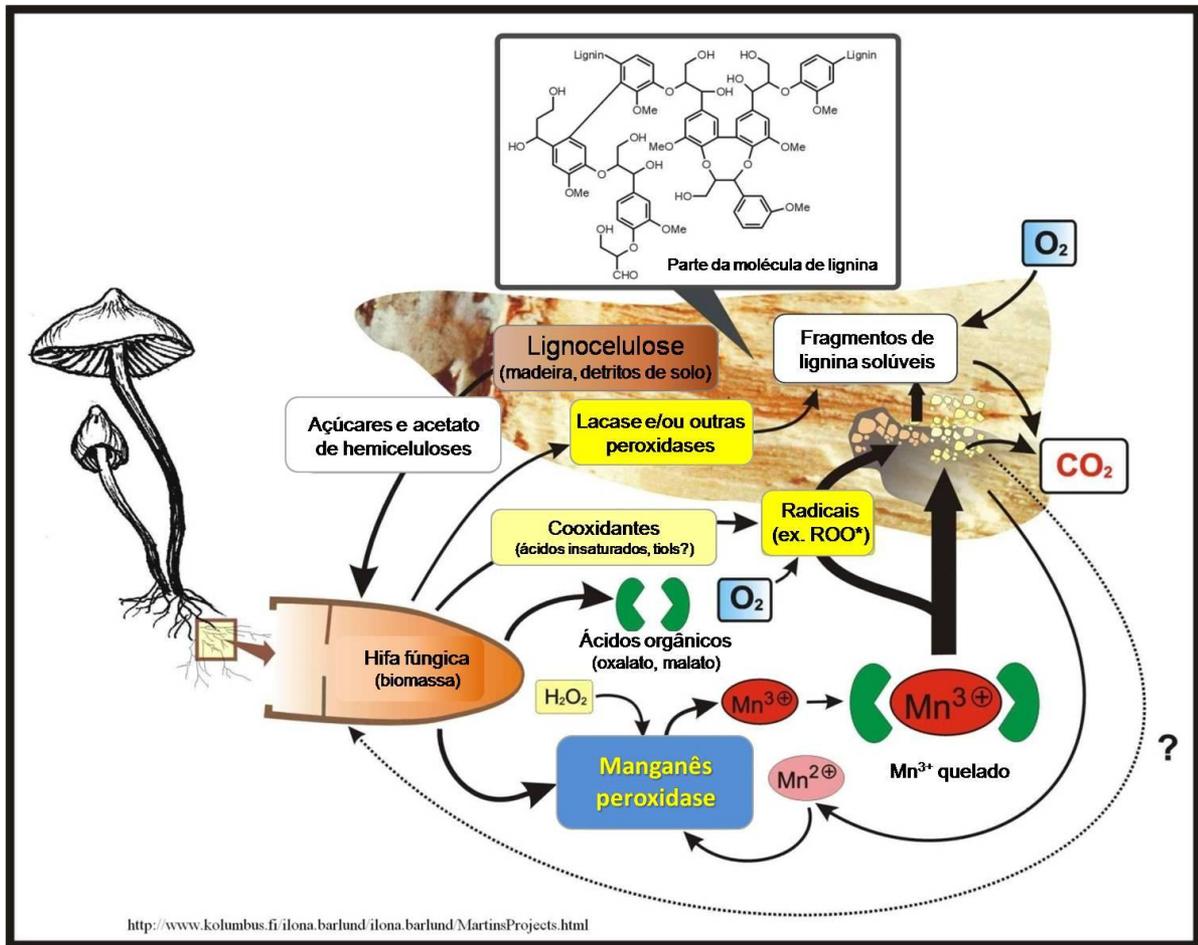


Figura 2 – Sistema de enzimas ligninolíticas pertencentes ao grupo das oxidoredutases provenientes de fungos basidiomicetos (adaptado de HOFRIKTER, 2000)

Outro grupo de importância ao complexo enzimático ligninolítico inclui as superóxido dismutases (SOD; EC 1.15.1.1). Estas enzimas, assim como as glicoxal oxidasas, geralmente atuam de forma coordenada, cooperando com as enzimas ligninolíticas, celulases e hemicelulases. Entretanto, elas nunca atacam os componentes da madeira de forma isolada. As superóxido dismutases são enzimas de distribuição universal, contendo ferro (FeSOD), manganês (MnSOD) ou cobre e zinco (CuZnSOD) em seu sítio ativo. Elas são as enzimas chave na proteção da célula fúngica contra o estresse oxidativo causado por espécies de oxigênio reativo (ROS) como: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais superóxidos aniônicos ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$). As SODs catalisam a reação dos radicais superóxido aniônicos com o oxigênio e peróxido de hidrogênio. Estes radicais superóxido aniônicos comumente aparecem durante a redução cíclica de quinonas e também durante a atuação de lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases

por fungos ligninolíticos. ROS agem como agente oxidante ou redutor, reagindo com outros radicais produzidos pelas enzimas ligninolíticas, contribuindo ainda para vários processos essenciais na transformação da lignina, como por exemplo, a quebra do anel aromático ou desmetoxilação (LEONOWICZ et al., 1999; GONZALES et al., 2002).

A fisiologia da produção e as propriedades físico-químicas de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase de fungos ligninolíticos para degradação da lignina e de poluentes orgânicos têm sido extensamente estudadas. A estas enzimas tem sido atribuído papel fundamental durante os mecanismos de biodegradação (KERSTEN et al., 1990; WESENBERG et al., 2003).

Por muitos anos, a participação de lacase na degradação da lignina foi considerada limitada à oxidação de unidades fenólicas, que compreendem unicamente de 10 a 20% do polímero. Entretanto, durante as últimas décadas tem sido demonstrado que lacase também pode oxidar unidades não-fenólicas de lignina na presença de certos compostos, conhecidos como mediadores, que incluem substratos artificiais (BOURBONNAIS; PAICE 1990, CALL; MÜCKE, 1997) e metabólitos fúngicos (EGGERT et al., 1996a). Lacases oxidam muitas substâncias recalcitrantes como: anilinas (HOFF et al., 1985), fluorene, pirene (SHÜITZENDÜEL; MAJANCHERCZK, 1999), estruturas relacionadas à lignina (BOYLE et al., 1992, BOURBONNAIS et al., 1996), compostos organofosforados (AMITAI et al., 1998), compostos modelos não-fenólicos de lignina (MAJCHERCZYK et al., 1999), fenóis (BOLLAG et al., 1988, d'ACUNZO et al., 2002), clorofenóis (BOLLAG et al., 2003), HPAs (MOUGIN et al., 2003), corantes aromáticos (SCHLIEPHAKE; LONERGAN, 1996; WESENBERG et al., 2003), e outras.

MnP, que gera Mn^{3+} , um poderoso agente oxidante, possui um papel chave no primeiro estágio de ligninólise. Mn^{3+} oxida determinadas estruturas aromáticas não-fenólicas de lignina, resultando na formação de radicais livres que reduzem Fe^{3+} e iniciam reações com o envolvimento de radicais hidroxilas. Durante a oxidação da lignina, o Mn^{3+} é quelado e estabilizado por ácidos orgânicos, atuando desta forma como mediador de baixa massa molecular, longe do sítio ativo de MnP. O sistema Mn^{3+} -quelados gera radicais reativos intermediários (radicais peroxi) a partir de ácidos graxos insaturados, como o ácido linolêico e outros derivados. O sistema MnP-lipídeo é forte o bastante para degradar ligações C_{α} - C_{β} de estruturas não-fenólicas de lignina, pela da abstração de hidrogênio do anel aromático (COLLINS et al., 1998, HOFRICHER, 2002; HIGUCHI, 2004, HERNÁNDEZ-LUNA et al., 2008). Além disso, MnP oxidam xenobióticos

recalcitrantes como: corantes têxteis (HEINFLING et al. 1998) e nitroaminotoluenos (VANAKEN et al., 1999).

Uma melhor compreensão do mecanismo ligninolítico de fungos basidiomicetos contribuirá para a geração de novas tecnologias ambientais "limpas" para aplicação industrial (HAMMEL, 1996, CHAGAS; DURRANT, 2001; MOREIRA NETO, 2006). Contudo, o mecanismo de degradação da lignina e de poluentes orgânicos não é o mesmo em todos os basidiomicetos ligninolíticos devido a composição e particularidades encontradas no sistema ligninolítico destes fungos. Galliano et al. (1991) estudaram a degradação da lignina (solubilização) por *Rigidoporus lignosus*, um organismo que não produz LiP, mas sintetiza lacase e MnP. Quando estas duas enzimas foram purificadas e suas propriedades estudadas *in vitro*, nenhuma destas enzimas foi capaz de solubilizar lignina radiomarcada. Quando ambas as enzimas foram adicionadas ao mesmo tempo à mistura de reação, a solubilização da lignina foi extensa; MnP e lacase atuaram sinergicamente. Além disso, glicose oxidase aumentou a solubilização da lignina por prevenção a repolimerização causada por radicais formados por MnP e lacase. Assim, torna-se importante o estudo do sistema enzimático ligninolítico de basidiomicetos que são utilizados em processos de biorremediação.

Em geral, os fungos basidiomicetos ligninolíticos são capazes de tolerar elevadas concentrações de poluentes orgânicos, o que possibilita a aplicação destes organismos na biorremediação (BARR; AUST, 1994). Porém, a presença do poluente orgânico nas culturas fúngicas pode interferir em processos metabólicos vitais para o organismo, incluindo alterações na produção e na atividade das enzimas ligninolíticas. Em organismos eucariotos, os xenobióticos podem promover a alteração de sistemas enzimáticos responsáveis por processos vitais, podendo ocorrer: aumento da atividade enzimática no meio extracelular por extravasamento da proteína para este meio, com conseqüente diminuição desta atividade no meio intracelular; aumento da atividade enzimática no meio extracelular ou intracelular por ativação enzimática, através da interação direta do agente químico com a enzima; aumento da atividade enzimática intracelular por indução na síntese da proteína; e diminuição da atividade no meio extracelular ou intracelular por inibição, através da interação direta do agente químico com a proteína (JONSSON, 2005).

Duas estratégias têm sido propostas para a utilização de enzimas ligninolíticas para a degradação de compostos recalcitrantes: (1) transformação direta de poluentes por culturas ativas de basidiomicetos ligninolíticos, e (2) o uso de enzimas extraídas do meio de cultura. Contudo, a

escolha da melhor estratégia irá depender dos objetivos e das condições ambientais empregadas durante o processo de biorremediação (NOVOTNY et al., 2001; TRUPKIN et al., 2003; NOVOTNÝ et al., 2004).

O *Phanerochaete chrysosporium* é amplamente estudado por sua habilidade em produzir lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Na presença de H_2O_2 , a manganês peroxidase é capaz de degradar a lignina e vários outros substratos fenólicos, entretanto, lignina peroxidase é capaz de degradar não só a lignina, mas também vários compostos aromáticos não fenólicos (GRGIC; PERDIH, 2003). O álcool veratrílico (3,4 dimetoxibenzil), um metabólico secundário, é sintetizado e acumulado no meio extracelular, apresenta no processo de biodegradação da lignina algumas funções, ou seja, induz o sistema lignolítico do *Phanerochaete chrysosporium* aumentando a produção de H_2O_2 e o nível de lignina peroxidase extracelular, sendo ele mesmo oxidado (LEE; MOON, 2003).

A importância das enzimas ligninolíticas extracelulares (lignina peroxidase, manganês peroxidase, lacases e outras peroxidases) na degradação/descoloração de efluentes têxteis e papelero têm sido estudadas por vários autores e por não serem específicas promovem a degradação de uma variedade de compostos poluentes como fenóis, pesticidas, explosivos além da lignina presentes nos efluentes municipais (DELLAMATRICE et al., 2005; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006), efluentes têxteis (KAMIDA, 2005) e papelero (DURAN; ESPOSITO, 1997).

2.6.1 Lacases

As lacases (E.C. 1.10.3.2) são polifenóis oxidases (fenoloxidasas) produzidas por fungos como também por plantas. São produzidas pela maioria dos Basidiomicetos e suas massas moleculares variam de 45 à 100 kDa (NETO, 2006) dependendo da espécie e da isoforma (DITTMER et al., 1997). As lacases catalisam oxidações por extração de um elétron de substratos fenólicos gerando radicais fenoxilas (AZEVEDO, 2004; LANGH, 1997). Esses radicais formados atuam nas reações não catalíticas como o acoplamento radical-radical, desproporção, desprotonação e ataques nucleofílicos pela água. Essas reações levam a polimerização, quebras alqui-arílicas, oxidações no Ca e desmetilações.

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes,

síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (SCHNEIDER et al., 1999; DURÁN et al., 2002, MAYER; STAPLES, 2002; NETO, 2006).

Até recentemente lacase era estabelecida somente em eucariotos (fungos, plantas superiores e insetos), mas agora há evidência de sua distribuição em procariotos, e a primeira estrutura cristalina de uma lacase bacteriana foi obtida. Em plantas, lacases estão envolvidas na lignificação. Em fungos, além da degradação de lignina, lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e patogenicidade de plantas. Em insetos, lacase catalisa a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (YAVER et al., 1996; ENGUITA et al., 2003; CLAUS, 2004).

Segundo Szklarz et al. (1989), essas enzimas são extracelulares, encontrando-se ligadas à membrana celular, ou, serem intracelulares como descrito para *Lenzites trabea*. Segundo Lobarzenwski (1990), alguns fungos, são capazes de produzir peroxidases extras ou intracelulares, de acordo com a constituição do meio de cultura. O fungo por ele foi estudado (*T. versicolor*), foi colocado em contato com a lignina e a forma intracelular da enzima migrou para a parede celular, permanecendo em uma forma imobilizada.

Em muitas espécies de fungos, a presença de lacases, indutivas ou constitutivas têm sido descritas. Usualmente a enzima origina-se no citoplasma, mas muitos exemplos de secreção têm sido descritos na literatura, entretanto, pouca atenção tem sido dada a localização sub-celular desta enzima e ao mecanismo de secreção (MAYER; STAPLES, 2002). A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura, taxa de aeração, etc (KAHRAMAN; GURDAL, 2002).

Fungos ligninolíticos freqüentemente expressam múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (BROWN et al., 2002). Não há dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas de lacase (atividade, estabilidade, pH e temperatura ótimos, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (MOUGIN et al., 2003, SHLEEV et al., 2004). Algumas características de lacases

como, massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico são extremamente diversos (MAYER; STAPLES, 2002).

Lacases participam de outros eventos ligninolíticos de grande importância, que foram primeiramente atribuídos a outras enzimas do sistema ligninolítico. Esses eventos incluem a oxidação de unidades não-fenólicas de lignina, a geração de H_2O_2 , a formação de radicais hidroxilas e a produção de Mn^{3+} a partir de Mn^{2+} . A participação de lacase na geração de espécies de oxigênio reduzida, por ex., radicais superóxido aniônicos ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , e $\cdot OH$, têm sido demonstrado por meio da oxidação de hidroquinonas derivadas de lignina. Além disso, duas vias de oxidação de Mn^{2+} por lacase têm sido descritas: a oxidação de Mn^{2+} pode ocorrer diretamente e também por oxidação de hidroquinonas como consequência da geração de $O_2^{\cdot-}$ (HÖFER; SCHLOSSER, 1999; GONZALES et al., 2002; SAPARRAT et al., 2002; SCHLOSSER; HÖFER, 2002).

Uma lacase artificial, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)), foi estudada e demonstraram que agia como um mediador, promovendo a oxidação de modelos de compostos de lignina não-fenólicos. A atividade da lacase em cultivos de fungos pode ser aumentada com a adição de diferentes compostos no meio. Diferentes fungos produtores de lacase secretam diferentes formas de lacase devido à suplementação de compostos aromáticos, como toluidina, ácido vanílico, ácido *p*-hidrobenzóico e anilina (FÄHREUS, 1962). O fungo *P. ostreatus* produz diversas lacases extracelulares, incluindo POXA1b, POXA1w, POXA2 e POXC. POXC é a isoenzima mais abundante produzida sob todas as condições de crescimento estudadas (PALMIERI, 1997). POXA1w exibe diferenças peculiares quanto a seu conteúdo metálico. Essa enzima contém dois átomos de zinco, um de ferro e apenas um de cobre por molécula (PALMIERI, 1997). Enquanto a adição de $CuSO_4$ em uma cultura de *P. ostreatus* causou forte aumento na atividade total de lacase e uma produção da isoenzima POXA1b, a POXA1w não foi afetada com a adição do suplemento de $CuSO_4$. A principal característica estrutural da enzima POXA1b é similar a enzima POXA1w, porém POXA1b produz uma lacase visível em um espectro UV e contém quatro átomos de cobre por molécula e também ambas são muito mais estáveis que POXA2 e POXC (PALMIERI, 1997; TANAKA, 1986).

Lacases são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reações com diferentes substratos, alguns destes recalcitrantes. São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em todos os domínios dos seres vivos. Contudo, muitos estudos são necessários para melhor compreender sua

importância fisiológica e sua utilização em processos biotecnológicos (CRECCHIO et al., 1995; CLAUS, 2004).

2.6.2 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular, glicosilada, de massa molecular que varia entre 38-62,5 kDa, mas a maioria das enzimas purificadas têm massa molecular próximo à 45 kDa (HOFRICHTER, 2002), e possui um grupo prostético heme. É dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} e α -cetoácidos como lactato são responsáveis por estabilizar sua atividade (AZEVEDO, 2004; KUHAD, 1997).

A produção de manganês peroxidase ou peroxidase dependente do manganês é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até agora, não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico capaz de produzir esta enzima. A capacidade de sintetizar MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos taxonomicamente distintos. Espécies colonizadoras de madeira, pertencente às famílias Meruliaceae, Coriolaceae e Polyporaceae, assim como basidiomicetos decompositores de serapilheira, das famílias Strophariaceae (família de *Psilocybe castanella*) e Tricholomataceae expressam atividade de MnP. Isoenzimas de MnP são freqüentemente produzidas e até 11 isoformas (LANGH, 1997; NETO, 2006) diferentes foram descritas para *Ceriporiopsis subvermispora*. Essas isoformas diferiram principalmente nos pontos isoelétricos (pI), que estiveram na faixa ácida (pH 3-4), embora isoformas na faixa neutra e menos ácida foram encontradas em determinados fungos (LOBOS et al., 1994).

O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido. A quebra subsequente da ligação O-O do peróxido requer a transferência de 2 elétrons do grupo heme da enzima, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina (MnP-I). Com a quebra da ligação dos oxigênios, uma molécula de água é liberada. Uma redução seguinte acontece formando o complexo MnP-II (Fe^{4+} -oxo-porfirina não radicalar). Um íon Mn^{2+} age como doador de 1 elétron para esse complexo intermediário e é oxidado à Mn^{3+} . A redução da MnP-II acontece de maneira similar e outro Mn^{3+} é formado de um Mn^{2+} , levando assim à geração da forma original da enzima, liberando uma segunda molécula de água. Ao passo que o MnP-I se comporta como LiP e como a peroxidase de raiz forte e pode, junto do íon Mn^{2+} , ser reduzido por outros doadores de

elétrons, o MnP-II é pouco reduzido por outros substratos e requer exclusivamente Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico (HOFRICHTER, 2002). O Mn^{3+} formado é estabilizado por ácidos orgânicos, tais como ácido oxálico, e age como um agente oxi-redutor difuso, de baixo peso molecular, que ataca moléculas orgânicas inespecificamente pela subtração de um elétron (GOLD; ALIC, 1993). Devido a inespecificidade do Mn^{3+} , o sistema MnP é eficiente para oxidação de vários poluentes orgânicos (NETO, 2006). A peroxidação de lipídios também tem sido sugerida na participação no processo de degradação de lignina por MnP (NOVIKOVA, 2002; SZKLARZ, 1989; TIEN, 1984).

Descobertas recentes sobre o papel de MnP na degradação da lignina permite a adoção dos conceito de Kirk e Farrell (1987), em que a degradação da lignina constitui um processo de “combustão enzimática” extracelular. Este conceito tem sido adotado por muitos microbiologistas que estudam a decomposição da madeira, e este conceito tem sido usado para descrever a despolimerização de lignina de alta massa molecular pela atuação inespecífica das enzimas ligninolíticas (HOFRICHER et al., 1998; SAYADI; ELLOUZ, 1995).

Uma cooperação "positiva" de MnP com outras oxidoredutases extracelulares como MnP e lacase, MnP e LiP, assim como MnP e celulases (celobiose desidrogenase) resultaram no aumento da despolimerização de lignina. Futuros estudos utilizando ^{14}C -ligninas, ^{14}C -polissacarídeos, assim como diferentes concentrações de Mn, em experimentos *in vivo*, poderão ajudar a compreender melhor o processo de mineralização da lignina e de poluentes orgânicos por basidiomicetos ligninolíticos (HOFRICHTER, 2002, NETO, 2006).

2.7 Estresse oxidativo

Os organismos aeróbios dispõem de vantagens energéticas utilizando o oxigênio molecular (O_2) como um oxidante terminal na respiração ou na oxidação de nutrientes. A presença do O_2 no ambiente celular pode provocar a oxidação das suas próprias estruturas devido ao seu potencial de agir como redutor parcial, formando as espécies ativas de oxigênio (EAOs) (FOYER et al., 1997; MALLICK; MOHN, 2000).

As EAOs, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), são produtos gerados pelo metabolismo dos organismos aeróbios durante seu crescimento e também por fatores ambientais, bióticos ou abióticos (MAHALINGAM;

FEDEROFF, 2003). O aumento na concentração de EAOs para níveis que ultrapassam a capacidade de defesa celular caracteriza o estresse oxidativo devido a ação tóxica e mutagênica das EAOs sobre as células (MALLICK; MOHN, 2000; YAO; MIN, 2006).

Os alvos biológicos da elevada reatividade das EAOs são DNA, RNA, proteínas e lipídeos, sendo este o principal alvo do estresse oxidativo devido ao ataque direto dos radicais livres sobre os ácidos graxos das membranas, iniciando a peroxidação lipídica (MARTINS, 2007).

O sistema antioxidante é uma defesa celular que proporciona a proteção contra os efeitos adversos da formação das EAOs por meio, entre outros, da ação de enzimas específicas reguladas transcricionalmente (MARTINS, 2007).

Entretanto, os estudos das respostas celulares aos estresses metabólicos não são apenas um tópico para microbiologistas e ecologistas desejando entender os mecanismos celulares básicos, apesar de sua relevância, mas também um assunto crucial para a área de tecnologia microbiana a qual tem que manter a viabilidade metabólica e vitalidade das linhagens utilizadas nas indústrias de fermentação. Estes estresses podem resultar numa redução ou restrição no crescimento e metabolismo das linhagens e afetar seriamente a indústria (PENNINCKX, 2000).

2.7.1 Enzimas antioxidantes

2.7.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada em eritrócitos bovinos em 1938 e sua função foi descrita em 1969, por McCorde e Fridovick. Presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos, esta enzima caracteriza um grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de H_2O_2 e O_2 a partir do O_2^- , livrando as células da oxidação por este radical.



A SOD é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAOs nas células (ALSCHER et al., 2002). É a única cuja atividade interfere nas concentrações de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss, que originam os radicais hidroxila (OH^\cdot) e, provavelmente por isso, representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER et al., 1992; ALSCHER et al., 2002).

Esta metaloenzima multimérica é classificada em quatro grupos, de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo (KEITH; VALVANO, 2007). O grupo manganês (Mn) SOD-A possui importante papel na mitocôndria; o grupo ferro (Fe) SOD-B é encontrado no citoplasma; o grupo cobre/zinco (Cu/Zn) SOD-C é observado no citosol e no estroma dos cloroplastos; e, finalmente, o grupo níquel (Ni) SOD é observado em bactérias do gênero *Streptomyces*, considerado um quarto grupo da enzima SOD (MALLICK; MOHN, 2000; OKAMOTO et al., 2001).

A presença desta enzima em tecidos fúngicos é bem conhecida (GIL-AD et al., 2000). Nestes microrganismos são encontrados dois tipos de SOD, a SOD-A (Mn) e SOD-C (Cu/Zn) (ANGELOVA et al., 2005). A SOD-A é um homotetrâmero (96 kDa) contendo um átomo de Mn por subunidade e a SOD-C possui duas subunidades idênticas de aproximadamente 32 kDa (MATÉS, 2000).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* a SOD-A é a primeira enzima de defesa contra o radical superóxido (GUIDOT et al., 1993). Entretanto, mutantes desta mesma levedura e do fungo *Neurospora crassa* não possuem a SOD-C, sendo mais sensíveis ao O_2 e radicais superóxido (CHARY et al., 1994).

2.7.1.2 Catalase (CAT)

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6), descrita em 1901 por Loew (FRUGOLI et al., 1996), é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Possui ampla distribuição e capacidade de degradar o H_2O_2 . Foi proposto por vários pesquisadores, que a CAT desempenha papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbios (MALLICK; MOHN, 2000).



A CAT é a única enzima entre aquelas que degradam o H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares, possuindo um mecanismo bastante eficiente para remoção do H_2O_2 formado nas células sob condições de estresse (MALLICK; MOHN, 2000). Esta enzima é encontrada nos peroxissomos, organelas onde ocorrem os processos que geram o H_2O_2 através da β -oxidação dos ácidos graxos (ANGELOVA et al., 2000).

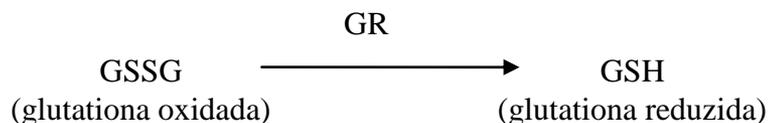
Existem três famílias de CAT, Mn-catalases, catalase-peroxidases bifuncional e catalases verdadeiras ou monofuncionais (ANGELOVA et al., 2005). As Mn-catalases incluem um elevado número de catalases de bactérias, plantas, fungos e animais (ANGELOVA et al., 2005). As catalase-peroxidases bifuncionais são encontradas em bactérias e fungos filamentosos, porém, não são observadas em eucariotos complexos (KAWASAKI; AGUIRRE, 2001). Nas catalases monofuncionais ou verdadeiras, encontram-se duas subunidades, uma com 50-65 kDa e outra com aproximadamente 80 kDa (ANGELOVA et al., 2005).

A CAT, provavelmente, utiliza mecanismos de dois estágios para as reações peroxidativas e catalíticas. No primeiro estágio, o Fe do grupo heme interage com o H_2O_2 formando peróxido de ferro, rico em O_2 , denominado componente I. Em baixas concentrações de H_2O_2 , este componente pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o etanol e o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações, o componente I reage com outra molécula de H_2O_2 , produzindo H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 1994).

Condições ambientais podem alterar a atividade da CAT. Em bactérias do gênero *Prochloron* sp, a atividade da CAT é diretamente proporcional a radiação UV, enquanto que a alteração na temperatura afeta a atividade da CAT em cianobactérias do gênero *Synechocystis* sp (LESSER; STOCHAJ, 1990; RADY et al., 1994). Duas isoformas de CAT foram identificadas no fungo *Aspergillus* sp. A CAT A, codificada pelo gene *catA*, cuja transcrição é induzida durante a esporulação e em resposta a estresses e a CAT B, codificada pelo gene *catB*, presente no micélio, cuja expressão é induzida pelo H_2O_2 ou H_2O_2^- , não possuindo controle regulatório pós-transcricional. Estas enzimas constituem mecanismos de defesa antioxidativa alternativo e específico para os diferentes estágios do ciclo de vida do fungo (CALERA et al., 2000).

2.7.1.3 Glutationa redutase (GR)

A enzima glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2) (VALLEJOS, 1983) possui ocorrência quase universal, distribuída em procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (FOYER et al., 1994). A GR contém grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD), transferidor de elétrons, que catalisa a redução dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) da glutationa oxidada (GSSG), para a glutationa reduzida (GSH) (VOET; VOET, 1995).



A importância da GR está na manutenção do equilíbrio GSH/GSSG na célula. A GSH é uma molécula que apresenta função essencial de manter as células no seu estado reduzido, atuando como agente antioxidante, interagindo diretamente com as EAOs ou reduzindo peróxidos através da ação da glutationa peroxidase (FUJII et al., 2000; ERLO, 2006).

Foi observado aumento da atividade da GR em microrganismos sob condições elevadas de irradiação UV, deficiência de água e estresses provocados por elevadas temperaturas (LESSER; STOCHAJ, 1990; SMIRNOFF, 1993; RADY et al., 1994).

2.8 Ecotoxicologia

A toxicologia ambiental e a ecotoxicologia são termos utilizados para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas ou outro material antropogênico liberado no ambiente. Está fundamentada no princípio de que a resposta dos organismos vivos depende da dose do tóxico a que foram submetidos, do tempo de exposição, da idade e das condições de saúde do organismo (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Segundo a Resolução CONAMA 357/05, as possíveis interações entre substâncias naturais e contaminantes passíveis de causarem danos aos organismos deverão ser investigadas utilizando-

se de ensaios ecotoxicológicos (bioensaios), toxicológicos ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

Os testes de toxicidade são realizados em condições padronizadas, nos quais os organismos-testes são expostos, em laboratório, à amostras coletadas em campo e à diferentes diluições destas, as quais contêm um ou mais contaminantes. O objetivo é medir os possíveis efeitos destes contaminantes e o grau de resposta associado às concentrações (SETAC, 1993).

Os bioensaios são essenciais quando se pretende avaliar um corpo de água e seus possíveis potenciais de causar toxicidade aos organismos, podendo ser utilizados para determinar e estabelecer: a toxicidade de agentes químicos; a presença de efluentes líquidos e lixiviados de resíduos sólidos; os critérios e padrões de qualidade das águas; os limites máximos de lançamentos de efluentes líquidos em corpos hídricos; o tratamento dos efluentes líquidos; a sensibilidade dos organismos aquáticos e os impactos resultados de acidentes ambientais (ARENZON, 2004).

Essa técnica utiliza os testes de toxicidade como ferramenta capaz de observar o impacto que as substâncias químicas puras ou misturas complexas exercem sobre os organismos vivos, abrangendo todo ou apenas algumas etapas do ciclo de vida (JARDIM, 2004).

Os organismos utilizados para avaliação da toxicidade podem ser de diferentes níveis tróficos e/ou funcionais, de preferência os organismos devem pertencer aos níveis tróficos padronizados mundialmente. Como por exemplo, os produtores primários representados por *Lactuca sativa* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, os consumidores primários *Daphnia magna* e *Daphnia similis* e os consumidores secundários *Hydra attenuata* e *Chironomus xanthus*. A importância no uso de mais de uma espécie está fundamentada na informação de que nenhuma espécie é sensível a todas as substâncias tóxicas e sua sensibilidade varia de acordo com o agente tóxico e com as condições ambientais (RODRIGUES, 2002; MESSIAS, 2008).

Na seleção dos organismos e das espécies algumas condições foram observadas como: sensibilidade constante a diversos agentes químicos, obtendo assim, resultados precisos, com boas repetibilidade e reprodutibilidade; possibilidade de manutenção em laboratório, pequeno porte e ciclo de vida curto; espécies presentes em épocas restritas e em pequeno número devem ser desconsideradas em favor daquelas abundantes e disponíveis ao longo do ano; importância para a estrutura e funcionamento do sistema por fim, espécies com estabilidade genética e que possibilitem a obtenção de lotes uniformes de organismos. Nesse caso se encaixam os

organismos: *H. attenuata*, *D. magna*, *C. xanthus*, *P. subcapitata* e *L. sativa* (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

H. attenuata são celenterados de água doce, pertencentes ao filo Cnidária e a classe Hydrozoa, encontrados em todos os corpos de águas continentais, exceto na Antártida e em profundidades com ausência de oxigênio. Os indivíduos da classe Hydrozoa são organismos sésseis, que se locomover contraíndo ou curvando a haste corporal e os tentáculos, reproduzem-se por brotamento e alimentam-se de microcrustáceos. *H. attenuata* possuem simetria radial, o corpo principal é um cilindro alongado de 2 a 25 mm de comprimento, possui um círculo de cinco ou seis tentáculos, no centro da coroa de tentáculos encontra-se a boca (MASSARO, 2006).

H. attenuata são organismos atrativos para estudos ecotoxicológicos por apresentarem mudanças morfológicas em condições de progressiva intoxicação, sua estrutura corporal intensificam seu potencial de detectar toxicidade, ocorrem em vários ambientes de água doce, fácil cultivo e manutenção em laboratório, os testes são de simples realização e baixo custo (TROTIER et al., 1997).

D. magna é um microcrustáceo de água doce, vulgarmente designado de pulga d'água devido aos movimentos específicos das segundas antenas que lhe dão a aparência de se deslocar em pequenos saltos. Apresentam carapaça ao longo do seu 1,5 mm de comprimento, se alimentam de algas e são as principais presas de vários peixes. Em condições naturais reproduzem-se por partenogênese cíclica, durante a maior parte do ano suas populações naturais são constituídas predominantemente por fêmeas, sendo os machos apenas abundantes na primavera e outono ou quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis como, por exemplo, variações de temperatura ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos excretos (ARAUCO, 2005).

Em laboratório, onde as condições ambientais são favoráveis e constantes, não ocorre a reprodução sexuada, e *D. magna* reproduz-se apenas partenogenicamente eliminando a variabilidade de ordem genética dos bioensaios. O seu ciclo de vida varia entre 40 dias a 25 °C, e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie tem juvenil de dois em dois dias e precisa de 6 a 10 dias para dar origem aos primeiros juvenis que são libertados nas trocas da carapaça (ARAUCO, 2005).

P. subcapitata (antiga *Selenastrum capricornutum*) pertence ao filo Chlorophyta, o gênero *Pseudokirchneriella* faz parte da classe Chlorophyceae, nessa classe são encontrados organismos

unicelulares e fotoautotróficos com simetria externa radial ou próxima de radial. Este gênero compreende de seis a oito espécies distribuídas pelo mundo, com células lunadas, isoladas ou em grupos constituindo colônias múltiplas, armazena seus alimentos como amido verdadeiro e têm parede celular rígida composta de celuloses com substâncias pépticas. Como todas as algas do filo chlorophyta de água doce possuem distribuição cosmopolita em solos e corpos d'água, motivo pelo qual tem sido amplamente utilizada em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais, além de serem recomendadas no registro de agentes químicos e pesticidas por órgãos ambientais nacionais e internacionais (OLIVEIRA, 2007).

Os efeitos tóxicos de determinada amostra-teste são avaliados por meio de variáveis biológicas como: letalidade, imobilidade, alterações no desenvolvimento, crescimento, reprodução, metabolismo, fisiologia e comportamento dos organismos-teste. Os testes ecotoxicológicos podem ser de dois tipos, agudo (compreendem os efeitos das substâncias tóxicas) e crônico (fornece informações complementares sobre a toxicidade não detectada nos testes agudos). Os testes de toxicidade fornecem informações sobre a letalidade relativa de um material, sendo delineado para determinar a concentração suficiente para causar efeito adverso a 50% dos organismos teste (CL_{50}). Essa concentração é estimada pela exposição a uma série de concentrações de uma solução e as respostas dos organismos são observadas (MELLETTI, 1997).

Os testes de toxicidade aguda medem os efeitos dos agentes tóxicos sobre as espécies durante uma curta fase da vida, em um período de 24 a 96 horas de exposição, são utilizados cinco concentrações e um controle (com sobrevivência de no mínimo 90%, para ser aceitável). As respostas obtidas são os “end points”, valores resultantes de medidas específicas feitas durante ou após a conclusão do teste de toxicidade. O critério utilizado para *D. magna* é o CL_{50} , pois a morte é observada nesses organismos, entretanto para alguns invertebrados a morte não é facilmente determinada e nesse caso é estimado o CE_{50} , cujo efeito observado é a imobilização. Em organismos como as algas são estimadas o CI_{50} , cujo efeito observado é a inibição do crescimento, neste caso a morte e a imobilização não são detectados (DELLAMATRICE, 2005; MESSIAS, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizados fungos lignocelulolíticos presentes no estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP, Piracicaba. Os microrganismos estocados foram mantidos em culturas desenvolvidas em extrato de malte e ágar (EMD Chemicals®) ou em sementes de trigo (item 3.2), refrigeradas a 4°C.

Os fungos pré-selecionados para este estudo foram: *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus shimeji*, *Trichoderma reesei*, *Ganoderma* sp., *Mucor pusilus*, *Aspergillus niger*.

Esses microrganismos foram então analisados quanto à produção de ligninases através do método de coloração por guaiacol (item 3.4).

3.2 Produção do inóculo “spawn” ou “semente-inóculo”

Os fungos foram repicados com inóculos “spawn” ou “semente-inóculo”. Esse inóculo foi desenvolvido para manter a atividade enzimática natural dos fungos, já que a constante repicagem em diferentes meios pode resultar em uma alteração genética e/ou enzimática (BURDEN; WHITNEY, 1995; SAID; PIETRO, 2002; STANBURY et al., 2003). O inóculo foi feito em sementes de trigo sem processamento, 0,8% de gesso e 0,2% carbonato de cálcio em relação ao peso seco das sementes, para a manutenção do pH. Foram mantidos em sacos de polipropileno de 20 x 25 cm e espessura média de 0,60 mm, com um orifício de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro que foi vedado com filtro tampão de algodão. Os sacos foram autoclavados a 1 atm e 121°C durante 30 minutos e inoculados depois de resfriados.

3.3 Condições de cultivo das linhagens

A transferência de duas ou mais sementes-inóculo dos fungos pré-selecionados do estoque para placas Petri com 10 mL de meio MEA (Malt Extract Agar; EMD Chemicals®) foi realizada com a utilização de pinças esterilizadas em infravermelho, em câmara de fluxo laminar horizontal e incubadas a 30° C ($\pm 1^\circ\text{C}$) de 6 a 7 dias. O meio de cultura continha 30,0 g de extrato de malte, 3,0 g de peptona de farinha de soja e 15,0 g de ágar, sendo adicionado 1000 mL de água destilada e

posteriormente autoclavado a 1 atm e 121°C, por 15 min. Essas linhagens foram então repicadas a cada 3 meses e usadas nos experimentos.

3.4 Produção de ligninases

Os fungos acima citados foram testados quanto à capacidade de produção de celulases e ligninases utilizando a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975) e Doerge (1997), com modificações quanto à utilização dos meios testados.

Foi elaborado um meio de verificação da produção de lignina contendo: 100 µL de guaiacol, 16 g de ágar e 1000 mL de água destilada.

O meio foi vertido em placas de Petri e pellets de 10 mm de cada linhagem crescida em MEA (extrato de malte e ágar) por 7 dias foram aplicados no centro das placas, lacrados e incubados a uma temperatura de 28°C por aproximadamente 7 dias para verificar a produção de ligninases.

Após o período de incubação, foi verificada a existência de halo de crescimento avermelhado no meio contendo guaiacol.

3.5 Vinhaça de cana-de-açúcar

A vinhaça foi doada gentilmente pela usina sucroalcooleira COSAN (Unidade Costa Pinto), localizada na cidade de Piracicaba (22°38'11.38" S e 47°41'03.80" O), SP, durante a safra de 2007/2008. Este resíduo foi recolhido em galões de 5 litros e mantido em câmara fria a 4 °C. Para sua utilização foi medido o pH, que variou nas diferentes coletas entre 3,95 e 4,5.

3.6 Seleção dos fungos para descoloração de vinhaça

Foram realizados testes com vinhaça em fermentação submersa com os fungos *P. chrysosporium*, *P. sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *P. shimeji*, *T. reesei*, *Ganoderma* sp., *M. pusilus* e *A. niger*, avaliando-se o potencial na descoloração do resíduo por 15 dias.

A descoloração foi calculada de acordo com a fórmula utilizada por Itoh (2005) e Sirianuntapiboon et al. (1995) a partir de medidas de absorvância a 475 nm: Descoloração (%) = [(absorvância inicial - absorvância observada) / absorvância inicial] x 100.

3.7 Preparo do meio de cultivo contendo vinhaça

Foram colocados em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, 100 mL de vinhaça com o pH corrigido para 6,0. O material foi autoclavado a 121°C e 1 atm, durante 15 minutos. Posteriormente, foram inoculados três discos (1,0 cm ϕ) de meio de cultura contendo os micélios/esporos dos fungos utilizados. O controle consistiu em material sem a inoculação dos fungos. Os frascos foram incubados por quinze dias em incubadora Tecnal modelo TE-420 com agitação orbital a 180 rpm, a 28±2°C, sob condição de escuro. Foram incubadas 3 réplicas de cada fungo.

3.8 Estudo do crescimento sobre o resíduo

O crescimento dos fungos foi observado em placas de Petri (meio sólido), sendo inoculados nestas, porções de micélios de 1 cm de diâmetro, em placas com um meio sintético para fungos (MSF) de acordo com Rodríguez et al. (2003) que continham os resíduos de vinhaça em concentrações de 25, 50 e 100%. Foi utilizado como controle o meio sintético sem resíduo e o pH ajustado a 6,5 em todos os casos. As placas foram incubadas durante 7 dias a 30°C, medindo-se o diâmetro da colônia diariamente.

3.9 Produção de enzimas por *P. sajor-caju* CCB 020

Foram colocados em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, 100 mL de vinhaça com o pH corrigido para 6,0. O material foi autoclavado a 121°C e 1 atm, durante 15 minutos. Após o resfriamento, foram inoculados três discos (1,0 cm ϕ) de meio de cultura contendo o micélio do fungo. O controle consistiu em material sem a inoculação do fungo. Os frascos foram incubados por 15 dias em incubadora Tecnal modelo TE-420 com agitação orbital de 180 rpm, a 28°C (\pm 2°C), sob condição de escuro.

As amostras foram recolhidas a cada três dias num período de 15 dias em um primeiro experimento e diariamente em um segundo experimento com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020.

Essas amostras foram filtradas a vácuo em papel de filtro Whatman n°. 1 (85 mm Ø). O sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e a biomassa acomodada em placas de Petri e congelada para verificação de peso seco. As atividades das enzimas ligninolíticas foram determinadas, sendo as reações realizadas em triplicata e as leituras de absorbância efetuadas com auxílio de espectrofotômetro FEMTO 432.

A biomassa foi quantificada por meio de gravimetria. A biomassa filtrada foi liofilizada (Thermo Savant, modelo modulyod 115) por 72 horas a -48°C e $-1,2$ mbar, sendo pesada periodicamente. Foram realizadas 3 replicas do fungo, coletadas a cada 3 dias durante um período de 15 dias.

3.10 Determinação da atividade de enzimas lignolíticas

3.10.1 Reagentes

Peróxido de hidrogênio: em 50 mL de H_2O destilada, adicionou-se 33 μL de H_2O_2 .

Lactato de sódio: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 1,2 mL de lactato de sódio.

Sulfato de Manganês: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 0,017 g de MnSO_4 .

Albumina bovina: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 0,25 g de albumina bovina (Albumin Bovine Fraction V, MP Biomedicals®)

Vermelho de fenol: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 0,05g de vermelho de fenol

Peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 2,7 g de succinato de sódio, então o pH foi ajustado para 4,5 e acrescentou-se 33,3 μL de 30% H_2O_2 .

Hidróxido de sódio: em 50 mL de H_2O destilada adicionou-se 4,0 g de NaOH.

Tampão Citrato-Fostato: 1,05 g de ácido cítrico foram adicionados em 50 mL de H_2O

destilada (solução A), separadamente 1,41 g de fosfato de sódio foi adicionada em 50 mL de H₂O destilada. Então a solução A foi adicionada na solução B e o pH foi ajustado para 5,0.

Siringaldazina: foi adicionado 0,05 g de siringaldazina (SIGMA®) em 50 mL de etanol.

Todos os reagentes foram estocados em refrigerador a 4 °C.

3.10.2 Atividade da enzima lacase (Lac)

A atividade de lacase foi determinada a 30°C usando mistura contendo 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0), 0,1 mL de solução contendo siringaldazina, que é o iniciador da reação e 0,6 mL da solução enzimática bruta (sobrenadante). A oxidação da siringaldazina foi medida pelo monitoramento do aumento da absorvância a 525 nm após 10 minutos de reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de siringaldazina por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $6,5 \times 10^4$ /mol/cm para a siringaldazina oxidada. A atividade da lacase foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (UI L⁻¹) (SZKLARZ et al., 1989).

Foram utilizados tubos de ensaio de 10 x 100 mm, tanto para amostra não fervida quanto para amostra fervida (controle negativo).

3.10.3 Atividade da enzima Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade de MnP na solução enzimática bruta, foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ mol cm}^{-1}$) na presença de manganês e H₂O₂ a 30°C. Em uma mistura de reação composta de 100 μL de tampão lactato de sódio (0,25 mol L⁻¹), 50 μL de solução de MnSO₄ (2,0 mmol L⁻¹), 50 μL de H₂O₂ em tampão succinato de sódio (0,2 mol L⁻¹) em pH 4,5, 200 μL de albumina bovina (0,5%) e 600 μL da solução enzimática bruta (sobrenadante), a reação foi iniciada com a adição de 100 μL de vermelho de fenol (0,1%) e a absorvância medida a 610 nm. Foi adicionado 40 μL de NaOH (2,0 N) como solução “stop” da reação após 10 minutos da primeira leitura. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn⁺³ por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $4,460 \times 10^3$ /mol/cm (KUWAHARA et al., 1984; GLENN et al., 1986; AITKEN;

IRVINE, 1990). A atividade da MnP foi expressa em unidade de enzima por litro de caldo enzimático (UI L⁻¹). Um tubo foi fervido por 10 minutos (controle) e depois retirado e resfriado.

3.10.4 Cálculo das atividades lignolíticas

$$UI/L = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad (1)$$

Onde,

ΔAbs = absorvância ($Abs_{final} - Abs_{inicial}$)

ε = coeficiente de absorção molar

R = volume de solução da amostra

t = tempo de reação em minutos

UI/L = Unidade Internacional, onde internacional significa $\mu\text{mol min}^{-1}$

- Coeficientes de absorção molar:

$$\varepsilon_{525\text{nm}} = 65000 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{610\text{nm}} = 4460 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

3.11 Determinação da atividade de enzimas associadas ao estresse oxidativo

A determinação das atividades enzimáticas do estresse oxidativo foi realizada no laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo.

3.11.1 Extração de proteínas de *P. sajor-caju* CCB 020

Após o período final de incubação em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo vinhaça 100% e tratada por 6, 9 e 12 dias, as amostras foram filtradas em papel de filtro (Whatman nº 1), separando desta forma o micélio do fungo. Os micélios foram colocados em um mortar, no qual foi adicionado nitrogênio líquido. Em seguida as amostras foram maceradas até formar uma farinha e posteriormente, foi adicionado o tampão de extração. Todo o procedimento foi realizado a temperatura de 4°C, inclusive com uma maior atenção para as soluções adicionadas e frascos

utilizados, para manutenção da integridade das proteínas, e conseqüentemente da atividade enzimática.

Os materiais foram homogeneizados em tampão de extração na proporção de 1g de amostra/ 4 mL de tampão e em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas para serem estocadas em freezer -80°C até o momento das análises (GOMES JUNIOR et al., 2007, POMPEU et al., 2008).

- Tampão de extração: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP.

3.11.2 Determinação das proteínas

Foi utilizado o método de Bradford (1976), para as determinações da concentração de proteínas totais, utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão.

3.11.3 Variações nos padrões protéicos

As proteínas da amostra fúngica foram inicialmente separadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando o sistema SDS-PAGE (AZEVEDO et al., 1998) e, posteriormente, corados com Comassie-Blue.

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante para desnaturá-las em subunidades. O agente dissociante comumente empregado é o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). A mistura de proteína com o tampão da amostra é aquecida para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto.

- *SDS-PAGE* - Para confecção dos géis desnaturantes (10% poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo:
 - a) Primeiro gel (de resolução):* 5,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200 µL de SDS (10%) e 10,0 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).
 - b) Gel superior (de empilhamento):* após a polimerização do gel de resolução, foi

adicionado uma solução composta por 1 mL da solução 40% de acríamida/bis-acrílamida (Sigma) citada anteriormente, 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8, 100 µL de SDS (10%) e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

Após polimerização, foram aplicados aos géis de SDS-PAGE os volumes das amostras correspondentes a concentração de 20 µg de proteína. O volume da amostra é aplicado juntamente com o tampão de amostra (3,0 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL de mercaptoetanol), na proporção de 1:1.

As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa, com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%). Posteriormente, os géis foram corados com Comassie-Blue e documentados.

3.11.4 Atividades das enzimas antioxidantes

As enzimas que tiveram a atividade analisada foram CAT, SOD e GR. As análises foram realizadas por atividade em géis não desnaturantes e por espectrofotometria, dependendo da enzima e de acordo com sua descrição.

- *PAGE não desnaturante* - Para confecção dos géis não desnaturantes (12% poliacrílamida) foi utilizado o mesmo protocolo para todas as enzimas (AZEVEDO et al., 1998):
 - Primeiro gel (de resolução)*: 6,0 mL de uma solução 40% de acrílamida/bis-acrílamida (Sigma), 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9 e 9,0 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).
 - Gel superior (de empilhamento)*: após a polimerização do gel de resolução, foi adicionado uma solução composta por 1 mL da solução 40% de acríamida/bis-acrílamida (Sigma), 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8 e 5,5 mL de água destilada. Para a polimerização foram utilizados 20 µL de TEMED e 100 µL de persulfato de amônio (1%).

O tampão de eletrodo para corrida do gel não desnaturante foi constituído por TRIS 250 mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina.

3.11.4.1 Atividade da enzima Superóxido Dismutase – SOD

A atividade da SOD foi medida em PAGE.

3.11.4.1.1 Atividade em PAGE não desnaturante

Foi realizada eletroforese em PAGE não desnaturante (12%) como já descrito, utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado de boi (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese (aproximadamente 3 horas de corrida, com corrente constante de 20 mA/placa), a atividade de SOD foi determinada como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971) (Tabela 1).

Revelação: após corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% de TEMED.

Ao final de 30 min, a mistura de reação foi descartada, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel.

Tabela 1 – Processo bioquímico para determinação de SOD segundo Beuchamp e Fridovich (1971)

	SOD	
	Presente	Ausente
Riboflavina + O ₂	O ₂ ⁻	O ₂ ⁻
Destruição catalítica do O ₂	O ₂ + H ₂ O ₂	O ₂ ⁻
Redução do NTT por O ₂ ⁻	NTT (incolor)	Blue formazana (cor azul escura)

Esta reação é caracterizada pela fotoxidação do gel. A riboflavina, por fotólise, providencia um elétron para o O_2 , resultando em o íon superóxido, O_2^- , o qual atua como redutor no composto NTT. Nesta reação o TEMED é catalisador, e resulta na forma reduzida do NTT, o Blue formazana.

Esta reação propicia a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem coloração, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em uma solução de ácido acético 7%, para então documentação do resultado.

3.11.4.2 Atividade da enzima Catalase – CAT

A atividade de catalase foi determinada como descrito por Kraus et al. (1995), com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998) por espectrofotometria.

Em temperatura de 25°C, a atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (25%), a qual deve ser preparada no momento do ensaio.

A reação foi iniciada com 25 μ L de extrato protéico, sendo a atividade determinada através da decomposição de peróxido de hidrogênio, monitorada por 1 min. através de alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados são expressos em mmol/minuto/mg de proteína.

3.11.4.3 Atividade da enzima Glutationa Redutase – GR

A atividade da GR foi determinada pelo método de espectrofotometria e também em PAGE não-desnaturante.

3.11.4.3.1 Atividade em espectrofotômetro

A atividade de GR foi determinada como sugerido por Lee e Lee (2000). A atividade foi analisada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 500 μ L de 5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico - DTNB) a 1 mM, 100 μ L de glutationa oxidada (GSSG) 1 mM e 100 μ L de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela

adição de 50 µL de extrato e monitorada por 1min por meio da redução de glutatona oxidada na absorvância de 412 nm. A glutatona reduzida, por sua vez, reduziu o composto DTNB, que representa cromóforo amarelo, dando a coloração característica do ensaio. Os valores de atividade foram expressos em µmol/min./mg de proteína.

3.11.4.3.2 Atividade em PAGE

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por Lee e Lee (2000), com uma eletroforese em PAGE não desnaturante (12%) utilizando como padrão uma unidade de GR.

Revelação: o gel foi lavado em água destilada (2x de 15 min.) e incubado por 30 min a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS (pH 7.5); 10 mg de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol); 10 mg DPIP (dicloroindolacético); 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para um volume final de solução de 50 mL. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e foi feita a fixação em solução de ácido acético 7%.

Após o aparecimento das bandas (coloração positiva) com cor rosada, a solução foi retirada e os géis documentados.

3.12 Toxicidade das amostras de vinhaça cultivada com *P. sajor-caju* CCB 020

Os testes toxicológicos foram realizados no laboratório de Ecologia Aplicada do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

3.13 Preparo e Manutenção dos organismos Testes

3.13.1 *Hydra attenuata*

As culturas de *H. attenuata* foram iniciadas em 1999 a partir de indivíduos adultos cedidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Saint. Lawrence Centre, Montreal, Canadá e cultivadas segundo a metodologia recomendada por Trottier et al. (1997). Os organismos foram cultivados em recipientes circulares de 20 cm de diâmetro e 300 mL de capacidade e em meio de cultura preparado com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e N-TRIS (hydroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfônico (Tampão TES), dissolvidos em 1 L de água destilada e, ajustado o pH para $7 \pm 0,1$. As culturas foram mantidas em incubadora a temperatura de 20°C , sob fotoperíodo de 12 h de luz e escuro.

Na alimentação das *H. attenuata* foi utilizado *Artemia salina* (camarões brine). Os cistos de *A. salina* foram colocados para eclodir em 7 g de NaCl dissolvidos em 500 mL de água destilada e, mantido sob aeração e aquecimento por 24 h. As *A. salina* eclodidas foram retiradas, lavadas com o meio de cultivo e administradas como alimento para *H. attenuata*. Após um período de 1 a 2 h o meio de cultivo era trocado para eliminar os exoesqueletos regurgitados.

3.13.2 *Daphnia magna* e *D. similis*

As culturas de *D. magna* tem a mesma origem que as de *H. attenuata* e *D. similis* foram iniciadas em julho de 2004, com fêmeas cedidas pelo laboratório de Ecotoxicologia do CENA/USP e mantidas segundo as normas da OECD (1998). Os organismos foram cultivados em Becker de 2 L de capacidade, com 20 fêmeas, em meio de cultura apresentando dureza de $250 \pm 25 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e pH entre 7 e 8, após aeração de 48 h.

O meio de cultivo da cultura estoque das fêmeas foi trocado três vezes por semana, juntamente com a retirada dos filhotes e restos da alimentação. As fêmeas foram alimentadas com uma suspensão de alga *P. subcaptata*, com densidade de alga de 10^5 indivíduos mL^{-1} e mais uma solução de fermento biológico (5 g L^{-1}) e ração para trutas (5 g L^{-1}), dissolvidos em água destilada e aerados por 7 dias. O sobrenadante utilizado foi filtrado em camada de gazes.

3.13.3 *Pseudokirchneriella subcapitata*

As culturas de *P. subcaptata* foram iniciadas em 1999 a partir de inóculos cedidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Saint. Lawrence Centre, Montreal, Canadá, provenientes de Culturas Americanas (ATCC n. 22662) e mantidas segundo as recomendações de Blaise et al.

(2000). Na preparação do meio de cultivo foram utilizados macro e micronutrientes, na forma de cinco soluções-estoque (Tabela 2), essenciais ao crescimento e desenvolvimento dessa micro-alga. O meio de cultivo continha 1 mL de cada solução estoque para cada 1 L de água destilada, pH de $7,00 \pm 0,01$ e autoclavado por 30 min a 121°C . A cultura foi encubada no meio de cultivo em temperatura ambiente, sob iluminação contínua de $4.000 \pm 10\%$ lux e, agitadas manualmente três vezes ao dia. Semanalmente as algas foram sub-culturadas, assegurando o suprimento das células.

Tabela 2 - Soluções-estoque para manutenção da cultura de *P. subcaptata*

Solução estoque*	Compostos	Quantidade utilizada em 500 mL
Micro nutrientes 1	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,08 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,20 g
	H_3BO_3	92,8 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	208,0 mg
	ZnCl_2	1,64 mg
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,9 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,63 mg
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,0 mg
Macro nutriente 2	NaNO_3	12,75 g
Macro nutriente 3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,35 g
Macro nutriente 4	K_2HPO_4	0,522 g
Macro nutriente 5	NaHCO_3	7,50 g

*Blaise et al. (2000)

3.14 Testes de toxicidade

Quando se estuda a toxicidade de soluções sabe-se que esse efeito nem sempre depende de uma única espécie química, alguns fatores podem afetar os resultados dos ensaios de toxicidade com organismos aquáticos, como: os estágios de vida, tamanho, idade e estado nutricional dos

organismos. Por isso, antes do início dos testes alguns cuidados foram tomados para que os resultados fossem confiáveis e respondesse apenas as amostras avaliadas, como a utilização de organismos da mesma idade e proveniente da mesma cultura (SANTOS, 2008).

Nos testes de toxicidade foram incluídos os controles negativo e o positivo com NaCl como substância de referência, conforme Santos et al. (2007). Estes visaram confirmar a autenticidade do método, dos materiais e dos reagentes empregados.

3.14.1 *Hydra attenuata*

A metodologia utilizada foi a proposta por Trottier et al. (1997) . As amostras de vinhaça 100% e vinhaça tratada com *P. sajor-caju* CCB 020 foram preparadas adicionando 14,7 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11 mg de tampão TES para cada 100 mL da amostra de pH $7,00 \pm 0,1$ e diluída em meio de *H. attenuata* nas concentrações de 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% e 1,5625% utilizando como controle negativo o meio de cultura.

Foram adicionados 4 mL da amostra e três *H. attenuata* saudáveis e sem broto por repetição em placas de poliestireno contendo 12 cavidades (3 repetições x 8 concentrações). A duração deste teste foi de 96 h, com observações realizadas com o auxílio de uma lupa (Leica, modelo Zoom 2000), a cada 24 h de exposição. Os efeitos avaliados foram mortalidade e danos morfológicos, efeitos sub-letais (Figura 3). Os danos morfológicos observados se apresentaram em estágios progressivos, primeiramente surge o aparecimento de bulbos na extremidade dos tentáculos dos organismos (Estágio de “Bulbos”), posteriormente tem o encurtamento dos tentáculos (Estágio “Curto”), e em ambiente com maior toxicidade ocorre perda dos tentáculos (Estágio “Tulipa”) e finalmente a morte do organismo. Estimativas de CE_{50} e CL_{50} foram realizadas. Posteriormente, segundo Arkhipchuk et al. (2006), as amostras foram classificadas em: indícios de toxicidade (81-100%), moderadamente tóxica (80-61%), tóxica (60-41%), altamente tóxica (40-21%) e extremamente tóxica (20-0%).



Figura 3 – Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de *H. attenuata*

3.14.2 *Daphnia magna* e *Daphnia similis*

A metodologia utilizada foi proposta por Dutka (1997). Nas amostras de vinhaça tratada e vinhaça 100% com *D. magna* e *D. similis*, grupos de cinco neonatos com até 24 h de idade foram colocados em frascos de polietileno contendo 30 mL da amostra a ser testada por 48h. As amostras sem diluição e diluída em água reconstituída para 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% e 1.625%, sendo que no controle negativo somente foi utilizado água reconstituída (OECD, 1998). Para todos os tratamentos, e em todas as diluições foram feitas quatro réplicas, inclusive nos controles.

3.14.3 *Pseudokirchneriella subcapitata*

A metodologia utilizada foi proposta por Blaise et al. (2000). Algumas condições de exposição foram respeitadas para que os resultados fossem aceitos, como: o coeficiente de variação do controle foi inferior a 40% e a densidade de células aumentou por um fator de no mínimo 16 vezes, no período de 96 h.

Iniciando esse experimento foi selecionada uma cultura-estoque de *P. subcapitata* de aproximadamente 6 dias, 25 mL do meio 18x (descrito no item 3.15.3) e uma solução tampão de 1 mL da solução estoque 5, dissolvida em 1 L de água destilada, os quais foram preparados e autoclavados por 30 min a 121°C, no dia anterior. O número de células presente nessa cultura-estoque foi determinado com o auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico (da

marca Carl Zeiss Jena modelo Jenamed 2). Em um tubo Falcon de 50 mL de capacidade foi pipetado o inóculo, a solução tampão e 18 mL de meio de cultivo, obtendo assim, uma concentração final igual a $2,6 \times 10^6$ cél mL⁻¹ (BLAISE et al., 2000), a qual foi utilizada na inoculação das células nas amostras ambientais avaliadas.

Para os testes com as amostras de vinhaça 100% e vinhaça tratada, populações de *P. subcapitata* do inóculo foram expostas à amostra sem diluição (100%), e diluída em frascos contendo meio de cultivo apropriado nas concentrações 75%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% e 1.625%. Os frascos permaneceram vedados com filme plástico transparente e incubados sob luz contínua ($4000 \pm 10\%$ lux) com lâmpadas frias fluorescentes, por 72 h, realizando agitação manual três vezes ao dia.

Após esse período foi contado o número de algas presentes nas amostras testadas, verificando a inibição do crescimento desses organismos. Segundo Blaise e Férard (2005) este efeito fitotóxico é agudo, uma vez que corresponde de 8-9 gerações de células.

3.15 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa Microsoft Office Excel e por teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,01$ (1%), utilizando o programa ASSISTAT versão 7.5 beta, 2008 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

A estimativa da toxicidade foi determinada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1978), para *H. attenuata*, *D. magna* e *P. subcapitata*, calculou-se os valores de CE₅₀/CL₅₀, CL₅₀ e CI₅₀, respectivamente. Para o organismo *H. attenuata* foram calculados os CE₅₀ baseadas no aparecimento que quaisquer danos morfológicos, efeitos sub-letais, constituindo um “end point” mais sensível. Para *D. magna* e *D. similis* somente foi calculado o CL₅₀. Para *P. subcapitata* foi calculado o CI₅₀, porcentagem de inibição do crescimento do organismo-teste em relação ao controle.

Através do programa Canoco versão 4.6 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998), foi feita a análise de redundância (RDA) onde os tratamentos com vinhaça pura (VP -100%) e vinhaça tratada (100%) após 15 dias com o fungo *P. sajor-caju* nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56% foram utilizados como variáveis respostas e os ensaios toxicológicos como variáveis explicativas.

A Análise de Redundância (RDA), usada para os testes de toxicidade consiste em uma técnica de ordenação direta baseada em cálculos de distância Euclidiana e assume relações lineares entre as variáveis explanatórias e dependentes, sendo indicadas para a ordenação de medições de potenciais tóxicos da água, em função das análises físicas, químicas, biológicas e concentrações dos elementos químicos e/ou outras possíveis variáveis ambientais (FONSECA, 2006).

Segundo Hair et al. (1995), a análise de redundância pode ser vista como uma extensão lógica de regressão múltipla, a qual envolve uma única variável dependente e diversas variáveis independentes métricas. Na análise de redundância o objetivo é correlacionar simultaneamente diversas variáveis dependentes (variáveis de critério) com diversas variáveis métricas independentes (variáveis preditoras). Assim a RDA identifica uma estrutura ótima para cada grupo de variáveis que maximize o relacionamento entre grupos de variáveis dependentes e independentes.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de linhagens pela produção de ligninases

Após o período de incubação dos fungos nos meios seletivos para peroxidases verificou-se a existência do halo de crescimento avermelhado (âmbar) no meio de cultivo nos seguintes fungos: *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus sajor-caju* CCB 020, *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus shimeji*, *Trichoderma reesei*, *Ganoderma* sp. (Figura 4, A₁, A₃, A₄, A₅, A₆, A₈). Isso confirma a capacidade de atividade lignolítica desses fungos, já que a oxidação do guaiacol ocorre por meio de peroxidases. Podemos também observar que não há formação de halo avermelhado nos seguintes fungos cultivados: *Aspergillus niger* e *Mucor pusilus* (Figura 4, A₂, A₇).

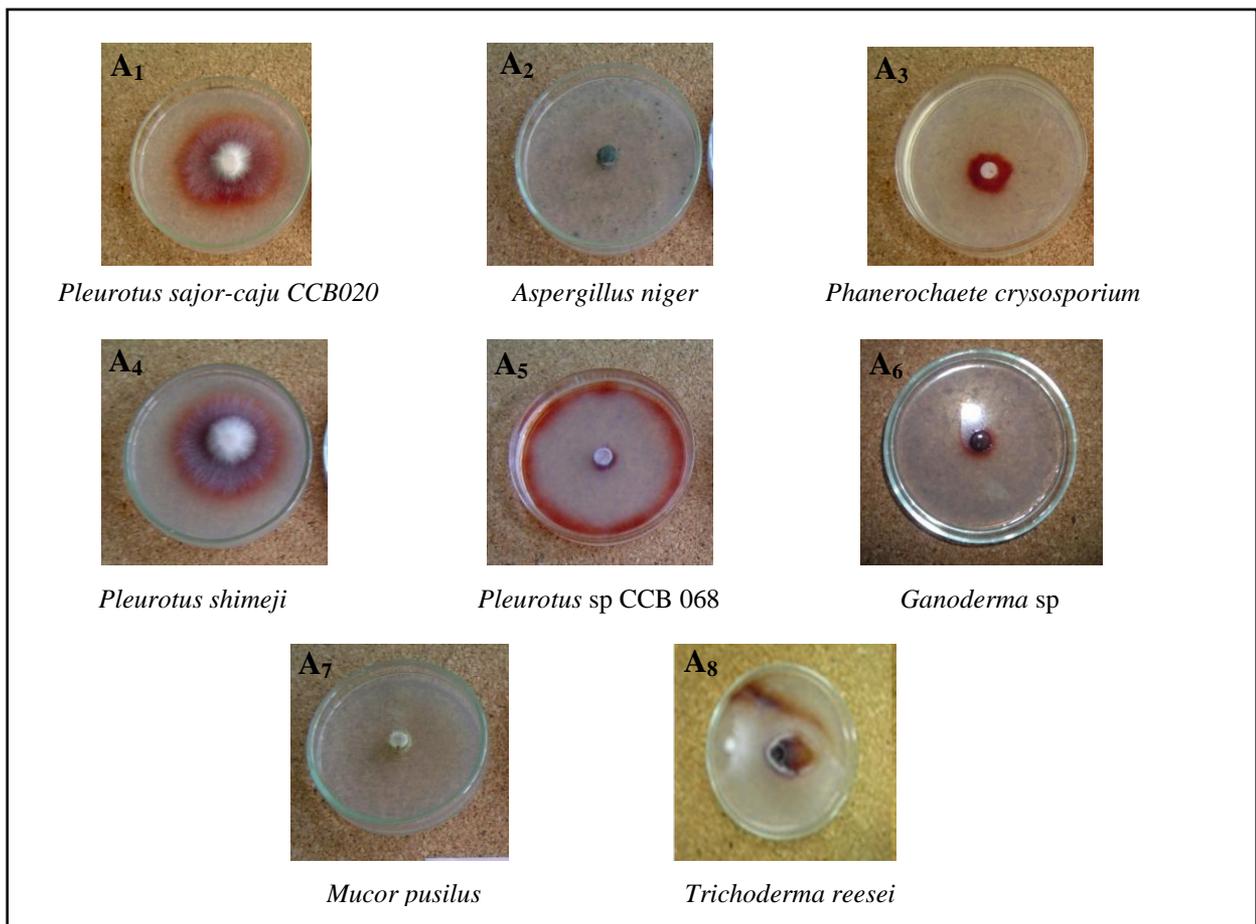


Figura 4 - Desenvolvimento de halo avermelhado em meio contendo guaiacol

4.2 Crescimento dos fungos sobre o resíduo

Observou-se uma grande variação no crescimento dos fungos pré-selecionados nos meios contendo diferentes concentrações de vinhaça (25, 50 e 100%) e em meio controle (Agar-MSF) (Tabela 3). Os fungos *P. chrysosporium*, *Ganoderma* sp e *Mucor pusillus* quando crescidos em 25 e 50% não mostraram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade e quando comparados com o controle. Entretanto a 100% ocorre redução no crescimento desses fungos, ocorrendo redução também para os fungos *A. niger* e *T. reesei* (Tabela 3). Por outro lado, os fungos do gênero *Pleurotus* apresentaram um bom crescimento, nas diferentes concentrações de vinhaça, inclusive a 100% quando comparado com o meio controle, ao nível de 1%, evidenciando o potencial deste gênero para biodegradar e descolorir a vinhaça (Tabela 3).

Estes dados são conflitantes com os encontrados na literatura sobre o crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* nas mesmas concentrações de vinhaça, no trabalho realizado por Rodriguez et al. (2003), no qual mostram que concentrações superiores a 50% levaram a um efeito inibitório do crescimento do fungo, devido a presença de compostos recalcitrantes e inibidores do crescimento, como compostos fenólicos.

Tabela 3 - Efeito da concentração de vinhaça sobre o crescimento dos fungos

Fungos	% do resíduo	$\mu\text{m dia}^{-1}$
<i>Phanerochaete Chrysosporium</i>	25	17.500 ^a
	50	16.500 ^a
	100	11.500 ^b
	Controle (MSF)	16.500 ^a
	Controle (MSF)	16.500 ^a
<i>Pleurotus sajor-caju</i> 020	25	6.800 ^a
	50	6.900 ^a
	100	7.150 ^b
	Controle (MSF)	3.357 ^c
	Controle (MSF)	3.357 ^c
<i>Pleurotus shimeji</i>	25	7.000 ^a
	50	6.760 ^a
	100	6.950 ^a
	Controle (MSF)	5.285 ^b
	Controle (MSF)	5.285 ^b
<i>Pleurotus</i> sp. CCB 068	25	7.750 ^{bc}
	50	9.250 ^a
	100	8.125 ^{ab}
	Controle (MSF)	6.900 ^c
	Controle (MSF)	6.900 ^c
<i>Ganoderma</i> sp	25	7.000 ^a
	50	6.900 ^a
	100	6.667 ^b
	Controle (MSF)	7.400 ^a
	Controle (MSF)	7.400 ^a
<i>Aspergillus niger</i>	25	10.333 ^{ab}
	50	9.833 ^b
	100	9.000 ^c
	Controle (MSF)	10.667 ^a
	Controle (MSF)	10.667 ^a
<i>Trichoderma reesei</i>	25	6.800 ^a
	50	6.167 ^b
	100	4.428 ^c
	Controle (MSF)	5.833 ^b
	Controle (MSF)	5.833 ^b
<i>Mucor pusillus</i>	25	12.000 ^a
	50	11.333 ^a
	100	9.500 ^b
	Controle (MSF)	11.333 ^a
	Controle (MSF)	11.333 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas. Para $\alpha=0,01\%$

A grande preocupação com a vinhaça advém basicamente de sua decomposição química e da quantidade na qual é gerada, o que a torna um grande poluidor (MACHADO, 1998). É caracterizada pela presença de polímeros de alto peso molecular chamados melanoidinas, que são formados pela reação de Maillard e compostos fenólicos (ácido tânico e húmico). Estas substâncias são frequentemente tóxicas para os microrganismos propícios aos biotratamentos de efluentes e altamente recalcitrantes, e possuem propriedades antioxidantes (MIGO et al., 1993; PÉREZ et al., 2006; MOHANA et al., 2008; NAIK, 2008).

Os basidiomicetos: *P. sajor-caju*, *P. chrysosporium*, *Pleurotus* sp. 068, *P. shimeji* e *Ganoderma* sp. apresentaram maior potencial de descoloração, seguido das linhagens de ascomicetos: *A. niger*, *T. reesei* e *M. pusillus*, na ordem de 98 a 48% (Figura 5), quando incubados em vinhaça 100% por 12 dias.

Estudos relativos à descoloração de melanoidina mostram a grande capacidade que os fungos basidiomicetos apresentam em descolorir este biopolímero natural, principalmente quando comparada a degradação do polímero sintético de melanoidina (SIRIANUNTAPIBOON et al., 1995). Os autores relatam também que o mecanismo de descoloração de melanoidinas envolve primeiramente a absorção dos pigmentos de melanoidina pelas células do micélio durante o crescimento de *Rhizoctonia* sp. D-90 e, finalmente sua acumulação intracelular no citoplasma, e próximo a membrana celular. Posteriormente, enzimas intracelulares atuam na degradação e/ou a melanoidina é absorvida nas células como uma macromolécula atuando como um “scavenger” (coletor) de peroxidases.

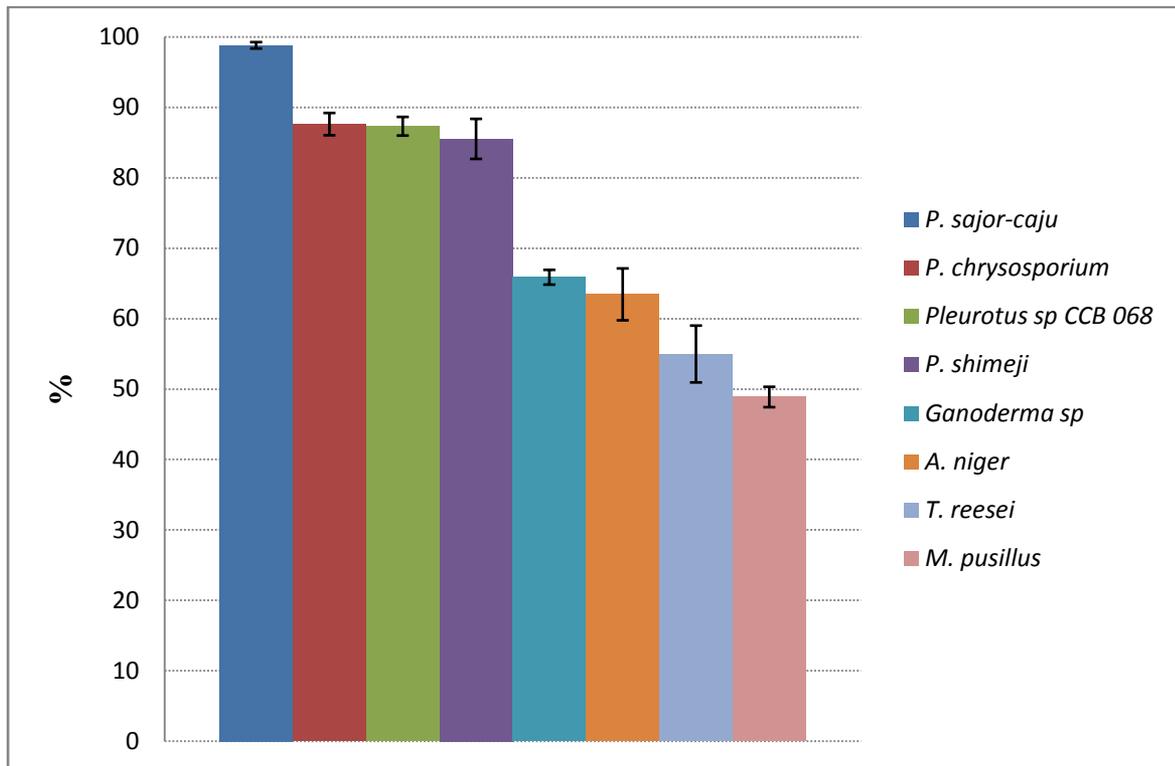


Figura 5 - Porcentagem de descoloração de vinhaça 100% por fungos basidiomicetos e ascomicetos após 12 dias de incubação

Como os fungos de degradação branca pertencentes aos basidiomicetos são eficientes e degradadores de compostos recalcitrantes, e o fungo *P. chrysosporium*, *T. reesei*, *A. niger*, *Ganoderma sp.* e *M. pusillus* já foram estudados extensivamente em diversos ensaios (BISARIA; GHOSE, 1984; KIRK et al., 1986; BERGUIN, 1994; DURÁN; ESPOSITO, 1997; CAMERON et al., 2000; FUJIAN et al., 2001; GRGIC; PERDIH, 2003; WESENBERG et al., 2003; SHAYEGAN et al., 2004; ANGAYARKANNI et al., 2003; MOHAMMAD et al., 2006; PANT; ADHOLEYA, 2007), esse trabalho foi estendido utilizando o basidiomiceto da espécie *P. sajor-caju* CCB 020.

O resultado da descoloração *in vitro* da vinhaça utilizando o fungo *P. sajor-caju* pode ser observado na Figura 6, demonstrando o potencial como agente de degradação de compostos orgânicos.



Figura 6 - Descoloração da vinhaça por *P. sajor-caju*: controle (a) meio sintético para fungos (MSF); (b) MSF com inóculo; (c) vinhaça 50% + MSF (V/V) e (d) vinhaça 50% + MSF (V/V) sem inóculo (controle positivo)

A cor da vinhaça é principalmente devido a presença de melanoidinas, caramelo, produtos de degradação alcalina e polifenóis. Estes compostos são originados a partir da fermentação do melaço durante o processo industrial (GOKARN; MAYADEVI, 2000). Entretanto, a cor devido à presença de lignina, caramelo e melanoidina persistem mesmo após um processo de anaerobiose como biometanização (GOKARN; MAYADEVI, 2000). O tratamento aeróbico usando o processo de lodo ativado quebra estes biopolímeros em compostos de menor peso molecular, sem, no entanto remover a cor e, conseqüentemente, o material de cor permanece no resíduo na forma de uma alta demanda química (DQO).

Até o presente momento, métodos biológicos, físicos e químicos são usados para a remoção de cor da vinhaça. Os métodos até então utilizados incluem a descoloração a partir da atividade enzimática microbiana envolvendo a quebra de melanoidina e floculação por substâncias secretadas por microrganismos. Os métodos mais modernos envolvem a oxidação destes compostos presentes no resíduo com ozônio e floculação usando coagulantes inorgânicos tais como sais de alumínio ou de ferro. Entretanto, estes métodos não são muito efetivos na remoção da cor do resíduo (MANE et al., 2006; MOHANA et al., 2008).

Os compostos responsáveis pela cor encontrados no processamento de cana-de-açúcar são normalmente materiais coloidais biopoliméricos carregados negativamente (GOKARN et al., 1998; GOKARN; MAYADEVI, 2000; MIGO et al., 1993). Todos estes compostos, com exceção do caramelo contendo grupos fenólicos em sua estrutura (SMITH; GREGORY, 1971) e os compostos fenólicos, contribuem para a formação destes colorantes (GROSS; COOMBS, 1976).

Entre o gênero *Pleurotus* há duas vias de degradação de lignina e compostos semelhantes a ela: (1) ocorre desmetilação anterior à abertura do anel aromático, (2) abertura do anel aromático já em primeira instância (RAJARATHANAN; BANO, 1989). *Pleurotus flabellatus* produz reação colorida com os compostos fenólicos e descoloração em corantes poliméricos, essa atividade relaciona-se ao sistema de enzimas oxidativas, do tipo lacase.

Um dos fungos mais estudados com habilidade para degradar e descolorir efluentes de destilarias são *Aspergillus* spp. *Aspergillus fumigatus* G-2-6, *Aspergillus niger*, *A. niveus*, *A. fumigatus* UB260, que apresentaram uma média de descoloração entre 69–75%, com uma redução da demanda química de oxigênio entre 70-90 (OHMOMO et al., 1987; MIRANDA et al., 1996; SHAYEGAN et al., 2004; ANGAYARKANNI et al., 2003; MOHAMMAD et al., 2006). Entretanto, como foi mostrado no presente estudo, o basidiomiceto *P. sajor-caju* 020 obteve uma descoloração de até 99% da vinhaça. Além deste potencial para descolorir a vinhaça o fungo pertence a uma classe de fungos que abrange aproximadamente 15.000 espécies, dentre as quais podemos citar os mais conhecidos mundialmente, *Agaricus blazei* (cogumelo do sol), *Pleurotus* spp. (shimeji), *Ganoderma* spp. e *lentinus edodes* (Shiitake) (PUTZKE; PUTZKE, 1998) De acordo com Pascholatti (1998) cerca de 200 cogumelos pertencentes à pelo menos 30 gêneros são considerados comestíveis, mas somente 20 destes são cultivados comercialmente e 5 em média são produzidas em escala comercial, incluindo *Pleurotus* spp. (hiratake ou shimeji).

4.3 Cultivo submerso de *P. sajor-caju* em vinhaça enriquecida com nutrientes

O cultivo de *P. sajor-caju* em vinhaça 100% resultou em maior quantidade de biomassa que a vinhaça diluída em meio contendo diferentes nutrientes (Figura 7). A adição de macronutrientes fundamentais para o crescimento, como fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio heptahidratado e uma fonte de nitrogênio como o extrato de levedura foram testadas na concentração de 0,5 e 2 vezes a contida no meio sintético para fungos (MSF) (Figura 7). A diferença de crescimento do basidiomiceto no meio contendo apenas vinhaça foi significativa (1,06 g L⁻¹), quando comparados aos demais tratamentos (0,83-0,91 g L⁻¹), que não diferiram estatisticamente entre si.

A biomassa de fungos tem sido estudada devido às suas diversas aplicações, por possuir composição química similar aos dos cogumelos produzidos em cultivo sólido, e com a vantagem de redução de resíduos devido à fermentação. Destaca-se o seu uso para alimentação, por ser um

rico suplemento protéico e fonte de lipídios. É usada também para extração de flavorizantes e de outros metabólitos, tais como enzimas e polissacarídeos (MAZIERO et al., 1999). Outrossim, a biomassa produzida em cultivo submerso pela espécie *Pleurotus ostreatus* pode servir de inóculo para a produção de cogumelos comestíveis, com comprovado valor nutricional, em cultivo sólido, utilizando-se resíduos lignocelulósicos (WISBECK, 2003; SMITH et al., 2002).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) e biomassa por diferentes linhagens de *Pleurotus* foram avaliadas por Wadt (2008), em cultivo submerso em meio com vinhaça e vinhaça adicionada de minerais. A produção de biomassa foi alta e rica em proteínas (variando de 3,5 a 6,0 g 100 g⁻¹) e de fácil digestão para ruminantes, proporcionando também a produção extracelular de polissacarídeos que podem ser utilizados para diversos fins.

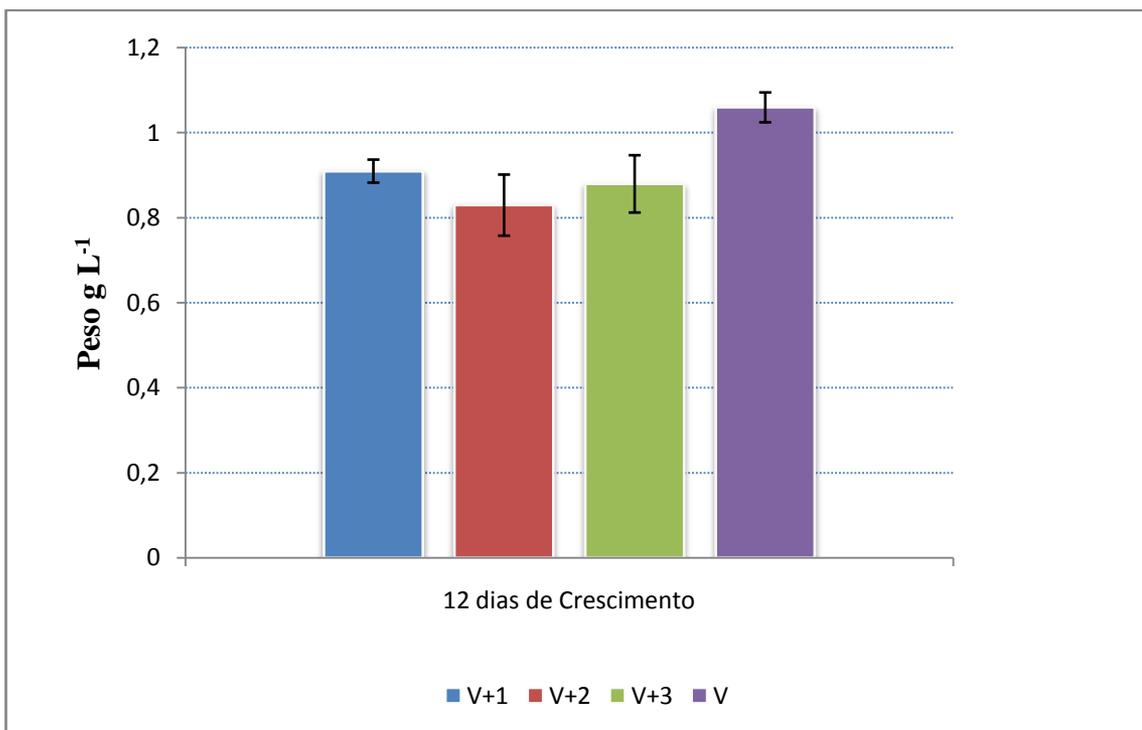


Figura 7 - Produção de biomassa por *P. sajor-caju* após 12 dias: **V+1** – vinhaça, extrato de levedura (0,25 g), KH₂PO₄ (1 g), MgSO₄ x 7H₂O (0,25 g); **V+2** – vinhaça, extrato de levedura (0,5 g), KH₂PO₄ (2 g), MgSO₄ x 7H₂O (0,5 g); **V+3** – vinhaça, extrato de levedura (0,75 g), KH₂PO₄ (3 g), MgSO₄ x 7H₂O (0,75 g); **V** – vinhaça 100%. O material foi incubado a 28 °C ± 2 e todos foram corrigidos para pH 6,0

4.4 Produção de enzimas lacases e Manganês peroxidase

O cultivo de *P. sajor-caju* sobre vinhaça (100%) e para os tratamentos com vinhaça + glicose; e vinhaça + meio sintético para fungos (Figura 8) apresentaram alta atividade (400-450 UI L⁻¹) para lacase aos nove dias de incubação. Os valores obtidos com os tratamentos contendo vinhaça + glicose e vinhaça + MSF foram levemente superiores, sem apresentar uma queda brusca aos 12 dias, como aconteceu no meio com a vinhaça 100%. No entanto não diferem estatisticamente quando comparado àqueles encontrados na vinhaça 100%.

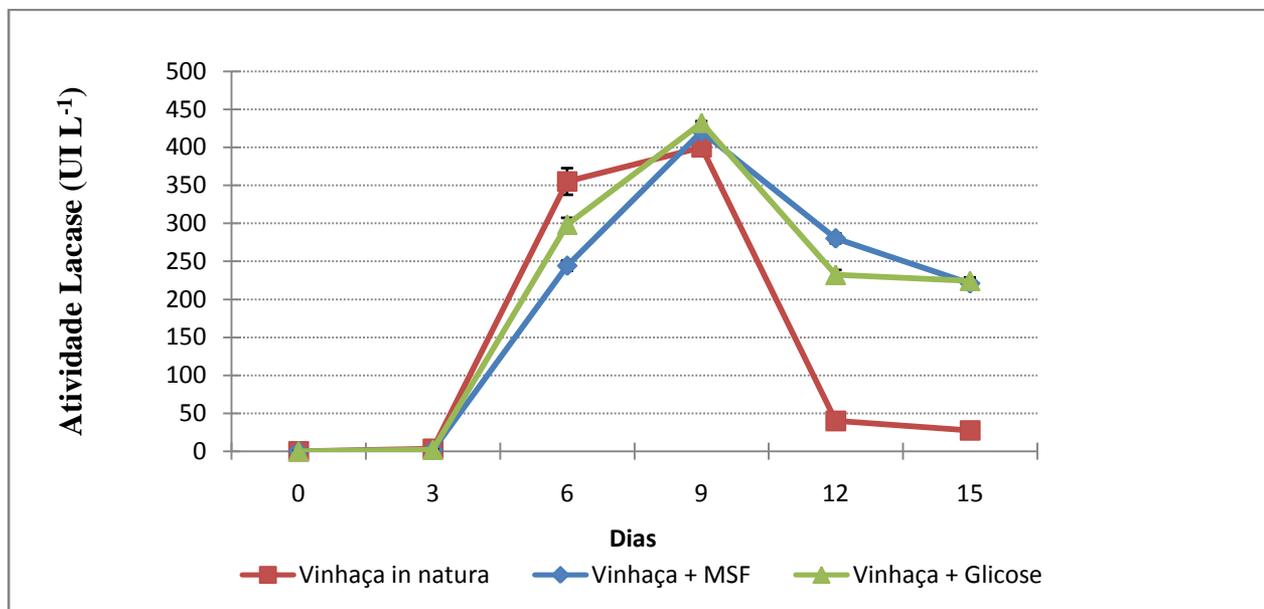


Figura 8 - Atividade de lacase por *P. sajor-caju* durante 15 dias de cultivo a 28 °C ± 2

De acordo com a literatura existem diferenças quanto ao perfil enzimático variando com o tempo, organismo empregado, meio e condições de cultivo (RODRÍGUEZ et al., 2003).

Os basidiomicetos do gênero *Pleurotus* não produzem lignina peroxidase (LiP), mas tem atividade de lacase, manganês peroxidase, peroxidases não dependentes de Mn e outras oxidases. As características genéticas das espécies e linhagens, assim como os parâmetros físico-químicos como pH, N, temperatura, oxigenação, presença de minerais interferem na produção e ação das enzimas (VYAS et al., 1994; TUOR et al., 1995, KAMIDA et al. 2005; ZHAO et al., 2008). A atividade desses fungos ocorre no metabolismo secundário e o pré-crescimento em materiais lignocelulósicos ativa o sistema de enzimas (MASAPHY; LEVANON, 1992).

Uma grande vantagem da enzima lacase está em não requerer a adição de peróxido de hidrogênio como co-fator, e em muitos trabalhos tem sido correlacionado a sua atividade com a degradação de compostos tóxicos e com a descoloração (RODRÍGUEZ et al., 2003).

Para MnP, o máximo de atividade foi atingido no 12º dia (60-80 UI L⁻¹) para todos os tratamentos estudados (Figura 9), indicando que o fator de estresse nutricional é um dos fatores responsáveis para a síntese desta enzima que é comprovadamente produzida durante o metabolismo secundário dos fungos, mantendo a atividade por todo o período de avaliação.

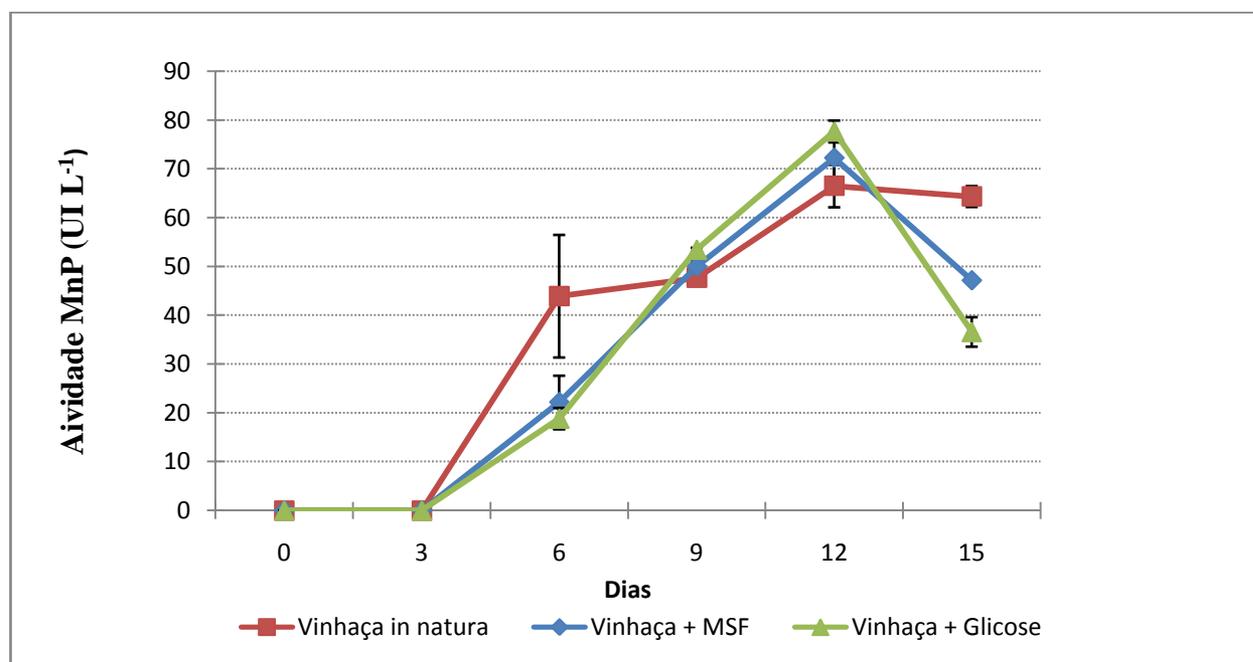


Figura 9 - Atividade de MnP por *P. sajor-caju* durante 15 dias de cultivo a 28 °C ± 2

Atividades de lacases e MnP foram avaliadas por Aguiar Filho (2008) em meio com bagaço e três espécies de *Pleurotus*. Em meio de bagaço umedecido com vinhaça, *P.sajor-caju* CCB020, observou que a lacase teve pico de atividade ao sexto dia e caiu próximo a zero ao nono dia, enquanto a MnP iniciou no sexto dia e teve o pico máximo de atividade ao 12º dia. Entretanto as atividades de ambas as enzimas foram bem abaixo, 10 a 17 UI L⁻¹, das encontradas aqui.

Kumaram et al. (1997) examinaram a produção e atividade de lacase durante o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* em substrato lignocelulósico (“sago hampas”) e obtiveram atividade de lacase máxima ao redor do sexto dia e apresenta como pH ótimo 6,0.

A redução da cor (Figura 10) e da turbidez (Figura 11) ocorrem a partir do terceiro dia e foi máxima ao 12º dia coincidindo com os períodos de atividades das enzimas. Estes resultados estão de acordo com o observado em outros estudos (KEREM et al., 1992; RAJARATHNAM et al., 1992; AKMEDOVA, 1994; LANG et al., 1996). Segundo Kerem et al. (1992), a lacase pode atuar na destoxificação de compostos do substrato como oxidar grupos fenólicos, agindo como enzima inicial na clivagem de cadeias laterais e anéis aromáticos das porções fenólicas da lignina.

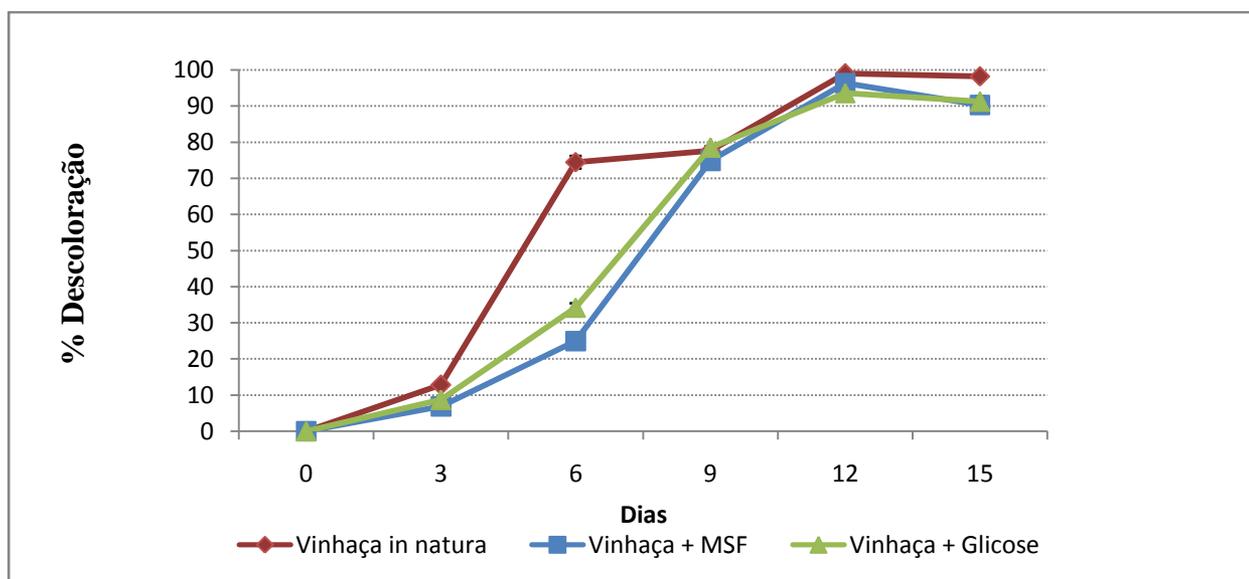


Figura 10 - Descoloração da vinhaça por *P. sajor-caju* durante 15 dias de cultivo a 28 °C ± 2

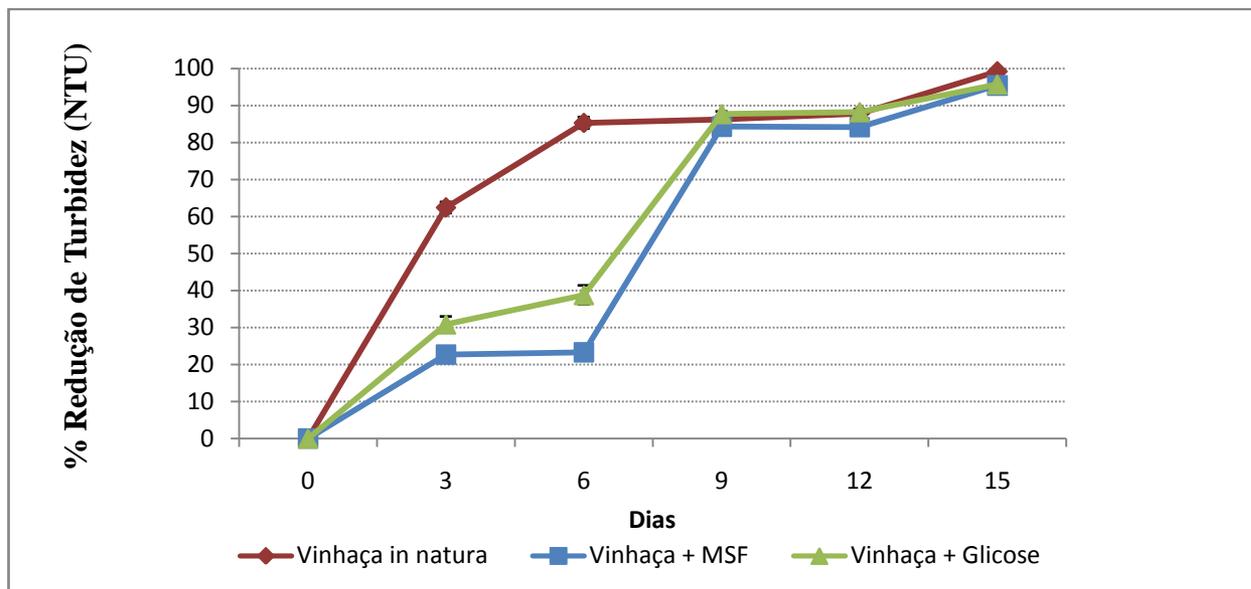


Figura 11 - Redução da turbidez (NTU- Unidade de Turbidez Nefelométrica) da vinhaça por *P. sajor-caju* durante 15 dias de cultivo a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$

A presença de substrato lignocelulósico pode induzir a produção de MnP e lacase, sendo ambas enzimas descritas como de ação conjunta (sinergismo) para a degradação de lignina e efluentes industriais (SCHLOSSER et al., 1997; KUMARAM et al., 1997; HOFRICHTER et al., 1999; RODRIGUES et al., 1999; KAMIDA et al. 2005; MOREIRA NETO, 2006; ZHAO et al., 2008). Dessa maneira, o resultado esperado para análise realizada seria um período comum de observação dos picos das duas enzimas, iniciando-se com a lacase e posterior atividade da MnP, como pode ser observado no presente trabalho.

De acordo com Rodríguez et al. (2003) a presença de compostos fenólicos e precursores flavonóides, para o caso da vinhaça (conhecidos como indutores da atividade de lacase) poderiam favorecer a síntese desta enzima e uma permanência da atividade enzimática por um período mais prolongado.

Em um segundo experimento avaliou-se a produção diária de lacase e manganês peroxidase em meio contendo vinhaça 100%. A lacase atingiu o máximo de atividade ($424,9\text{ U L}^{-1}$) ao décimo dia de cultivo (Figura 12), coincidindo com seu perfil anterior (Figura 8) e com outros trabalhos de degradação de resíduos, onde a atividade de lacase de *Pleurotus* spp. aumenta rapidamente desde o sexto dia de fermentação obtendo-se um máximo aos 10-13 dias (DAS et al., 1997).

As maiores porcentagens de descoloração das amostras tratadas coincidem com uma maior atividade da enzima MnP ($100,9 \text{ U L}^{-1}$), entretanto altos níveis de descoloração já foram alcançados quando foi atingida uma máxima atividade de lacase (Figura 12). A descoloração do resíduo segue um comportamento similar na tropofase (metabolismo primário) com relação à mesma fase da atividade da enzima, observando-se um aumento da velocidade de ocorrência a partir do sexto dia, coincidindo com a excreção significativa da enzima lacase no meio contendo vinhaça (Figura 12). É nesta etapa onde existe também uma maior disponibilidade de nutrientes e segundo Pellinen e colaboradores (1988), Rodríguez et al. (2003) e Kumar et al. (1997), quando a glicose é utilizada como substrato para o crescimento, uma concentração mínima de 2 g L^{-1} é necessária para que o fungo mantenha a sua capacidade de descoloração, obtendo-se os níveis mais altos de remoção em concentrações altas de glicose (concentrações maiores de 10 g L^{-1}). Como se observa na Figura 10, se evidencia que a lacase é excretada em estados tardios do crescimento do fungo, participando de modo significativo na descoloração deste resíduo. Quando as condições do meio começam a ser limitantes para o crescimento (idiofase), se produzem outras enzimas como a manganês peroxidase ou mecanismos com a finalidade de degradar compostos complexos (relacionados geralmente com a cor).

De acordo com Lang et al. (1997) *Pleurotus sp* apresentou alta atividade de MnP e lacase em meio líquido enriquecido com glicose e a lacase desempenha papel primordial no início da degradação.

Segundo a literatura consultada, as enzimas ligninolíticas podem ser inativadas por processos bióticos e/ou abióticos, como adsorção a matriz orgânica do substrato fúngico, desnaturação por acidez ou alcalinidade extrema, desnaturação irreversível pela exposição prolongada a radicais produzidos pelas enzimas ou biodegradação por proteases (CHEFETZ et al., 1998, LI et al., 1999; PALMIERI et al., 2000; AHN et al., 2002; KEUM;LI, 2004). Gianfreda e Bollag (1994), estudando o comportamento de enzimas imobilizadas e não imobilizadas em solos, observaram que houve um decréscimo na atividade enzimática quando a quantidade de matéria orgânica era elevada. Os autores concluem que o efeito inibitório da atividade enzimática foi causado pela presença de constituintes orgânicos do solo, como substâncias húmicas e fúlvicas. Entretanto substâncias húmicas podem ser geradas pela reação de lacases com compostos fenólicos durante a degradação da vinhaça pelo fungo, contribuindo para a perda da atividade e da estabilidade de enzimas ligninolíticas (CHEFETZ et al., 1998; AHN et al., 2002, FASANELLA,

2008). A substância húmica é parte da matéria orgânica, logo a vinhaça vai ser degradada e formar substância húmica, onde a enzima reage com ela e perde a atividade, ficando ligada e sem função

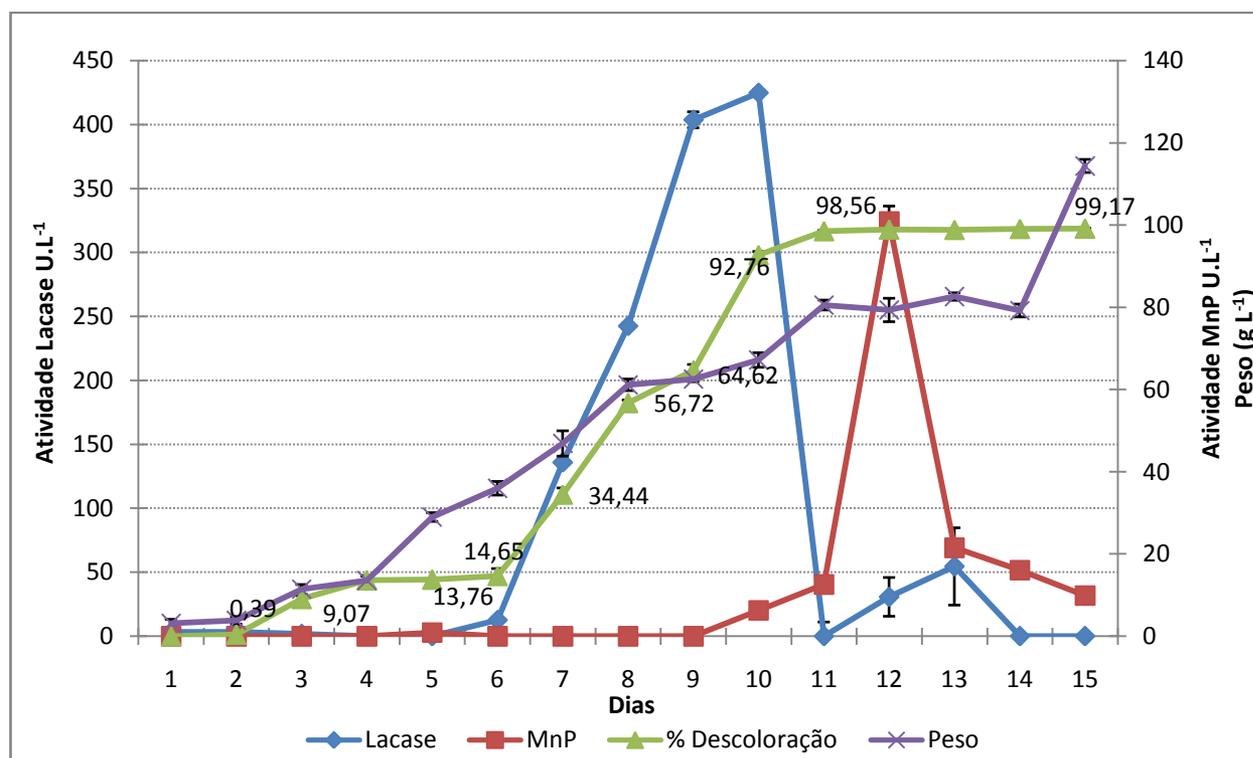


Figura 12 - Relação entre a atividade de lacase, manganês peroxidase, descoloração e produção de biomassa sobre resíduo de vinhaça (100%) durante 15 dias de cultivo com *P. sajor-caju* a 28 °C ± 2

De acordo com Das et al. (1997) a produção de lacase parece estar diretamente relacionada com a quantidade de biomassa produzida, o mesmo acontecendo com outras espécies de *Pleurotus*. Em contraste com outros fungos ligninolíticos nos quais a atividade ligninolítica se expressa e aumenta em concentrações limitantes de nutrientes no cultivo (ex: as atividades de lignina peroxidase e manganês peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*), em *Pleurotus* a lacase não é regulada por condições limitantes de nutrientes, pois quantidades suficientes ou em excesso destes estimulam esta atividade e a produção de biomassa (Figura 8; Figura 12. Comportamento similar da atividade de lacase tem sido evidenciado em estudos com fungos da

podridão branca produtores de lacase e manganês peroxidase (KEREM et al.,1992; RODRÍGUEZ et al., 2003).

4.6 Análise físico-química da vinhaça

Além do potencial da biomassa para nutrição, a linhagem de *P. sajor-caju* mostrou capacidade de remoção de cerca de $\pm 99\%$ da cor presente na vinhaça, que pode ter sido devido à degradação de frações de menor peso molecular da melanoidina (KUMAR et al., 1998). A turbidez também apresentou elevada redução ($\pm 99\%$) concomitantemente com o aumento da descoloração do resíduo durante os 15 dias de tratamento com o fungo *P. sajor-caju* 020 (Figura 13).

A incubação de *P. sajor caju* em vinhaça resultou em uma grande redução da demanda química de oxigênio (82,76%) e demanda bioquímica de oxigênio (75,29%) em fermentação submersa após incubação a 28 °C por quinze dias (Figura 14).

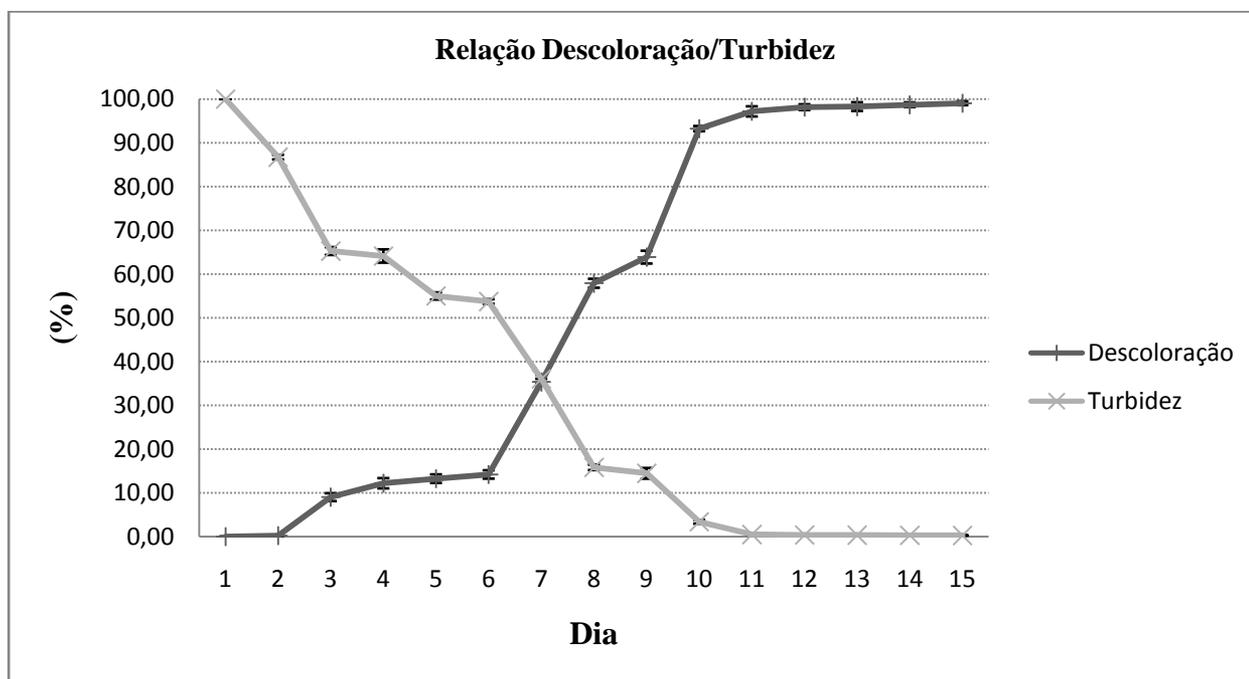


Figura 13 - Turbidez e descoloração da vinhaça 100% tratada com *P.sajor caju* por 15 dias a 28 °C ± 2

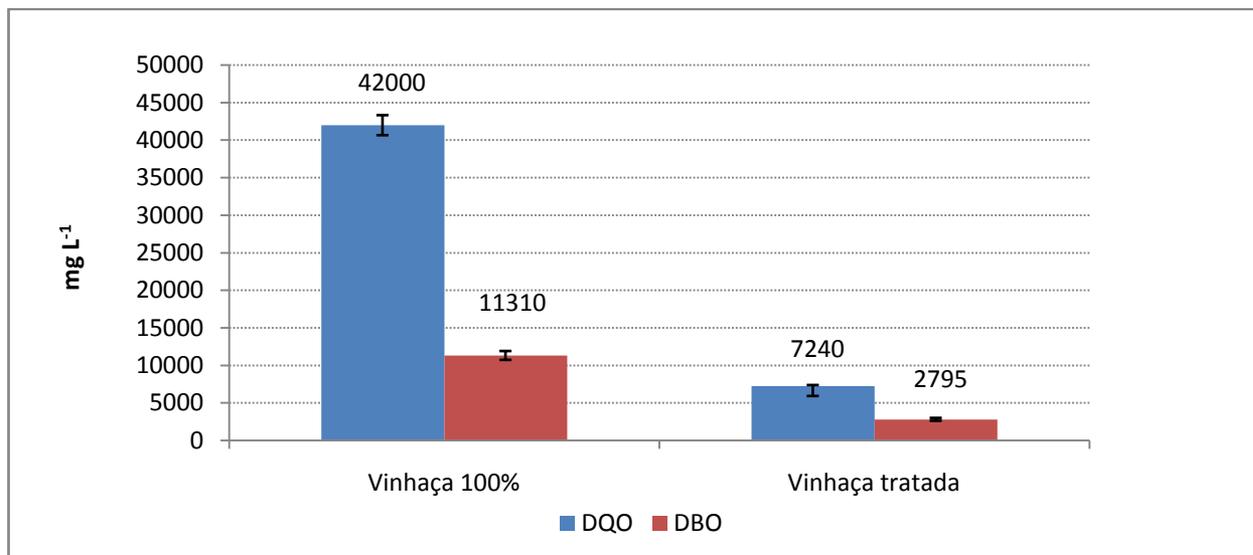


Figura 14 - Análise de DQO e DBO após tratamento da vinhaça 100% com o fungo *P. sajor-caju* a 28 °C ± 2

O tratamento de vinhaça com o fungo *P. sajor-caju* CCB 020 resultou em alterações nas características físico-químicas quando comparado a vinhaça antes de ser realizado o processo de biodegradação pelo fungo (Tabela 4). Ocorreu redução na maioria dos parâmetros analisados, tais como fenóis (98,18%), sólidos suspensos totais (97,58%), fosfato (85,50%), cálcio (69,56%), DQO (82,76%) e DBO (75,29%). Açúcares redutores (34,19%), magnésio (24,14%), sulfato (19,32%), condutividade (18,07%), sólidos totais dissolvidos (9,03%) e potássio (7,87%) apresentaram uma redução em quantidade menor quando comparado com as características anteriores. Por último, as quantidades de nitrogênio e sódio apresentaram-se 1,6 e 8,85 vezes maior quando comparado com o resíduo 100%.

Segundo Freire e Cortez (2000), o potássio é o mineral mais abundante presente na vinhaça, seguido de sulfato, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo. Estes dados estão de acordo com a composição mineral presente na vinhaça utilizada no presente trabalho, com exceção do nitrogênio, que apresentou uma concentração 2,85 vezes menor que o fósforo. Provavelmente esta contradição ocorreu porque a vinhaça é um resíduo que possui composição química variável, sendo dependente do mosto utilizado durante o processo industrial.

A concentração de fósforo em vinhaça tratada foi 6,9 vezes menor quando comparado a não tratada e a vinhaça proveniente do mosto de caldo de cana relatada por Freire e Cortez (2000), enquanto os valores de cálcio, enxofre, magnésio, potássio foram 3,29, 1,25, 1,32, 1,1 vezes menor que a vinhaça 100% sem tratamento.

Tabela 4 - Caracterização do resíduo de vinhaça 100% e vinhaça tratada

Parâmetros	Vinhaça 100%	Vinhaça tratada
pH (a 20°C)	3,95	5,34
DQO (mg L ⁻¹)	42000	7240
DBO (mg L ⁻¹)	11310	2795
Sólidos Suspensos Totais (mg L ⁻¹)	5969	204
Condutividade (µS/cm)	8630	7070
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	152126	138387
Açúcares Redutores (mg L ⁻¹)	962	633
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg/L)	70	112
Potássio (mg L ⁻¹)	2272	2093
Fosfato (como P) (mg L ⁻¹)	200	29
Magnésio (mg L ⁻¹)	290	220
Sódio (mg L ⁻¹)	< 50	442
Cálcio (mg L ⁻¹)	460	140
Sulfato (mg L ⁻¹)	1320	1065
Índice de fenóis (mg L ⁻¹)	1,1	0,02

De acordo com Chang e Miles (1984, 1989) e Wadt (2008), o mineral mais abundante dos cogumelos é o K, seguido de P, Na e Mg, sendo os minerais absorvidos do substrato pelo micélio e transferidos para os corpos de frutificação, o que mostra a importância do uso da vinhaça como substrato para o crescimento de *P. sajor-caju*.

Os fungos da degradação branca fazem parte de um grupo de microrganismos amplamente utilizados na área de biorremediação de efluentes. Estes fungos produzem isoformas de oxidases extracelulares incluindo lacases, peroxidase dependente de manganês e lignina peroxidase, as quais estão envolvidas na degradação de lignina em seu substrato lignocelulósico natural. Este sistema ligninolítico está diretamente envolvido na degradação de vários compostos xenobióticos e corantes (WESENBERG et al., 2003). Recentemente Pant e Adholeya (2007) isolaram três culturas de fungos e identificaram por métodos moleculares como sendo das espécies *Penicillium pinophilum* TERI DB1, *Alternaria gaisen* TERI DB6 and *Pleurotus florida* EM 1303. Estas culturas demonstraram produzir enzimas ligninolíticas e capacidade para descolorir o efluente de destilarias de cana em 50,47 e 86%, respectivamente. O tratamento de resíduos de destilaria com fungos do grupo dos ascomicetos, tais como *Penicillium* spp., *Penicillium decumbens*, *Penicillium lignorum*, reduziu em 50% a cor e a DQO do efluente, e obteve uma remoção de 70% dos compostos fenólicos (JIMNEZ et al., 2003).

4.5 Efeito da vinhaça 100% sobre a atividade de enzimas antioxidantes

Nos organismos aeróbios as vantagens energéticas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração são significativas, entretanto, a presença do oxigênio no ambiente celular constitui-se numa ameaça constante às suas próprias estruturas e processos. Este fato ocorre devido à formação das EAOs (espécies ativas de oxigênio) (MALLICK; MOHN, 2000), que podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada (RICE-EVANS et al., 1991). Espécies ativas de oxigênio (ROS) como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio "singlet" (1O_2) são um produto inevitável do metabolismo dos organismos aeróbios (ANGELOVA et al., 2000), e provocam "estresse oxidativo" devido à sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA et al., 2000; MALLICK; MOHN, 2000).

Como todo organismo aeróbio, os fungos também sofrem com os efeitos tóxicos do oxigênio molecular. As ROS causam danos nos componentes celulares oxidando os lipídios (BHATTACHARJEE, 1998), proteínas e ácidos nucleicos (ANGELOVA et al., 2000). Para combatê-las, as células dos fungos possuem tanto defesas antioxidantes enzimáticas, como, catalases, peroxidases e superóxido dismutases (TEKCHANDANI, 1998; CALERA et al., 2000; NOVENTA-JORDÃO et al., 1999; ANGELOVA et al., 2000), como não enzimáticas (CALERA et al., 2000). A exposição dos microrganismos aeróbios aos mais variados fatores de estresse, tais como calor, agentes oxidantes, tratamento com drogas, raio X e radiação UV, vem sendo associada à indução na síntese de enzimas antioxidantes (ANGELOVA et al., 2000).

4.5.1 Quantificação de proteínas e variação do perfil protéico

Os teores de proteínas nos micélios (Figura 15) mostram que entre os períodos de 6, 9 e 12 dias em meio controle o fungo não apresentou alteração significativa na quantidade total de proteínas solúveis. Entretanto foi possível notar diferenças significativas entre os períodos analisados quanto à concentração de proteínas no meio com vinhaça 100%. Neste tratamento, houve aumento na concentração de proteínas do sexto para o nono dia de crescimento, o que pode indicar um aumento do estresse fúngico durante este período, com conseqüente aumento da atividade metabólica (ANGELOVA et al., 2000).

Porém, no décimo segundo dia, houve uma intensa redução de proteínas na presença da vinhaça 100%, o que pode ser resultado da oxidação de proteínas decorrente do estresse oxidativo causado pelo meio de cultivo. De acordo com Cabicol *et al.* (2000), o aumento no estresse oxidativo em *Sacharomices cerevisiae* pode contribuir para o desenvolvimento de perigos a cerca de oxidação de proteínas, gerando modificações na estrutura protéica e até mesmo mudanças funcionais. A maioria dessas modificações é deletéria a célula, e podem também estar relacionadas ao aumento na frequência de proteólise.

A Figura 16 mostra alterações no perfil de padrão de bandas observadas no gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Foi possível observar diferenças quanto à indução ou repressão de proteínas específicas nos diferentes tempos de crescimento do fungo sobre o resíduo e em meio controle, como também diferenças quanto a ausência e presença de bandas nos diferentes tratamentos.

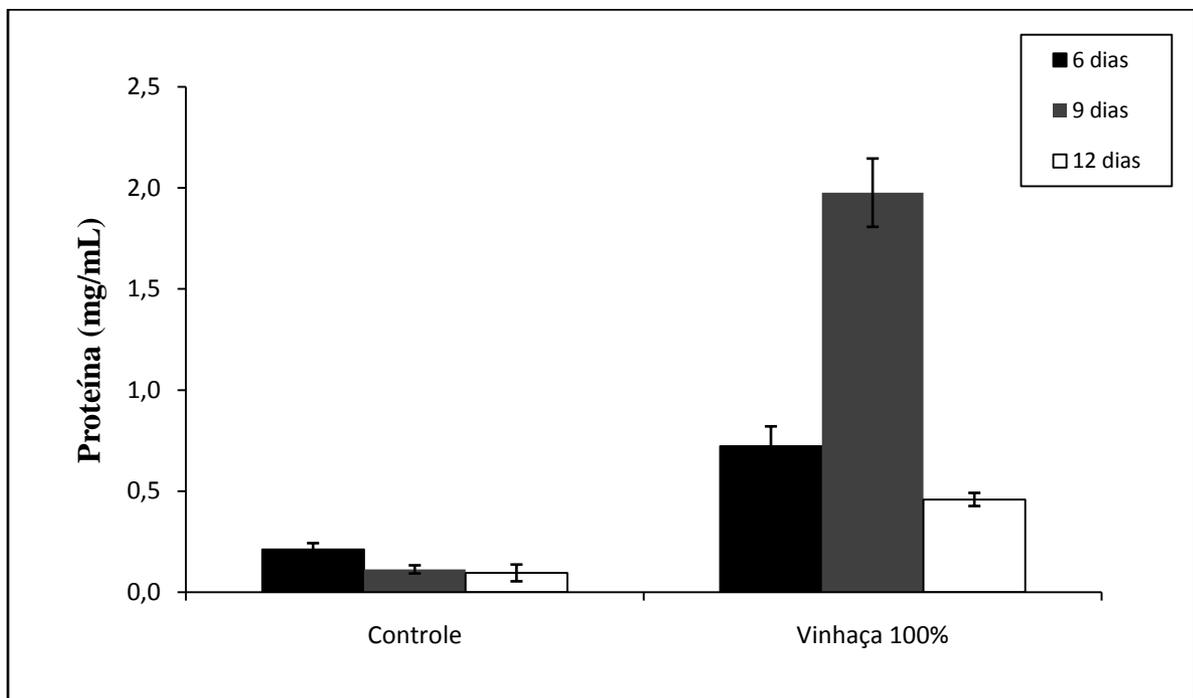


Figura 15 – Quantificação de proteínas solúveis (mg mL^{-1}) extraída do micélio mostrando o efeito do crescimento do fungo *P. sajor-caju* 020 no período de 6, 9 e 12 dias no meio controle (C) (MSF) e em vinhaça (V) 100%

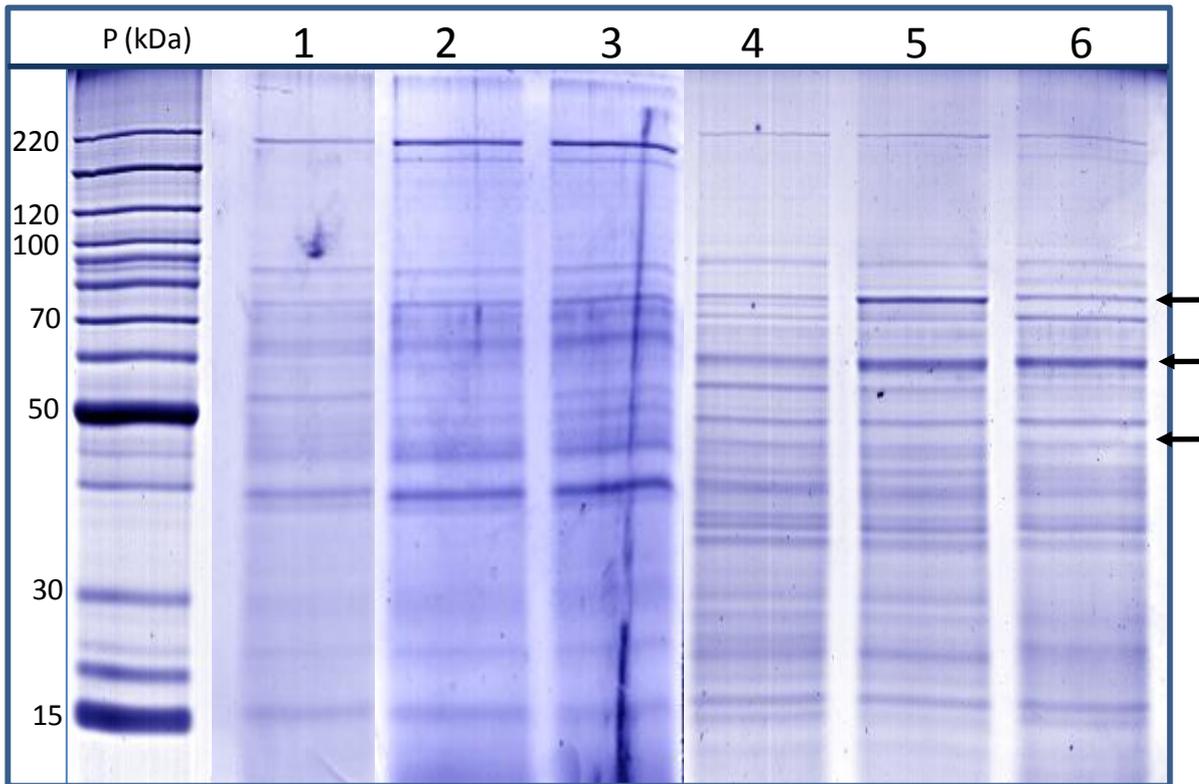


Figura 16 – Proteína em gel SDS-PAGE. Padrão (P) BSA; 1, 2, e 3 representam amostras de 6, 9 e 12 dias de crescimento do fungo no meio de vinhaça 100%

No intuito de verificar um possível estresse oxidativo causado em *P. sajor-caju* em função do seu crescimento em vinhaça e um segundo meio controle descrito por Rodríguez et al (2003), foi determinada a atividade de algumas enzimas antioxidantes responsáveis pela defesa contra as espécies ativas de oxigênio (EAOs).

4.5.2 Atividade de SOD em PAGE não desnaturante

A atividade da superóxido dismutase (SOD), enzima que catalisa a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 a partir de radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$), foi avaliada através de PAGE-nativo (Figura 17). O fungo *P. sajor-caju* apresentou o mesmo padrão de bandas para SOD entre os meios, controle e com vinhaça 100%. Foi possível observar duas isoformas, sendo que a isoforma A.I e B.I apresentou maior atividade em relação a outra isoforma. Quando *P. sajor-caju* foi crescido em meio contendo vinhaça, foi observado um aumento na atividade da isoforma B.I e

B.II quando comparado ao controle, entretanto as isoformas A.II e B.II são inversamente expressas nos três tempos de crescimento nos respectivos meios (Figura 17).

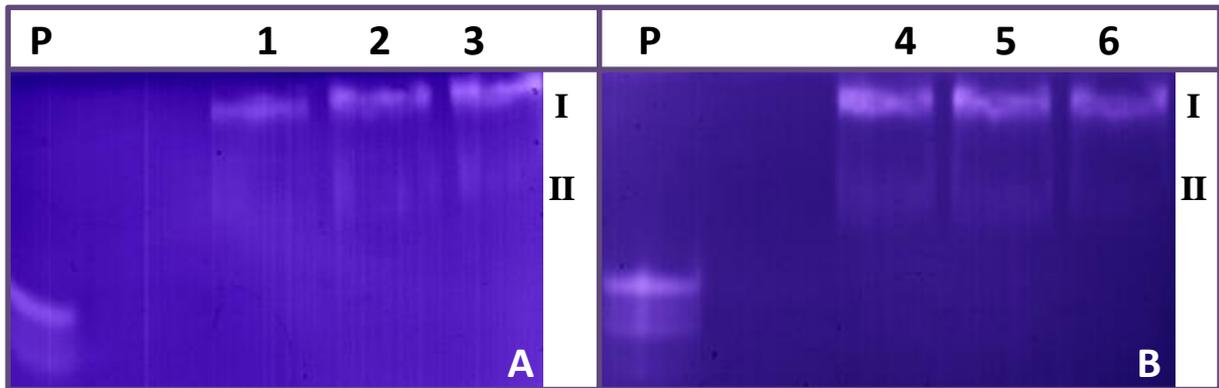


Figura 17 – Atividade da enzima SOD em PAGE não-desnaturante. Padrão (P) de SOD de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam 6, 9 e 12 dias de crescimento de *P. sajor-caju* 020 em MSF (Meio Sintético para Fungos) e 4, 5 e 6 representam 6, 9 e 12 dias de crescimento do fungo no meio com vinhaça 100%

As SODs catalisam a reação dos radicais superóxido aniônicos à oxigênio e peróxido de hidrogênio. Estes radicais superóxido aniônicos comumente aparecem durante a redução cíclica de quinonas e também durante a atuação de lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases por fungos ligninolíticos. As EAOs agem como agente oxidante ou redutor, reagindo com outros radicais produzidos pelas enzimas ligninolíticas, contribuindo ainda para vários processos essenciais na transformação da lignina, como por exemplo, a quebra do anel aromático ou desmetoxilação (LEONOWICZ et al., 1999; GONZALES et al., 2002).

A exposição de *A. nidulans* ao metal pesado cádmio aumentou a atividade de SOD, no entanto, sem haver aumento diferencial para alguma das três isoformas produzidas. Porém, houve decréscimo da atividade no tempo mais prolongado de exposição ao metal (GUELFY et al., 2003). Os mesmos autores também verificaram aumento da atividade de catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR), com o aumento da concentração e tempo de exposição ao xenobiótico.

4.5.3 Atividade de CAT em espectrofotômetro

A influência da vinhaça 100% foi verificada sobre a atividade da enzima CAT, sendo esta responsável pela decomposição do H_2O_2 , originando como produtos H_2O e O_2 (Figura 18).

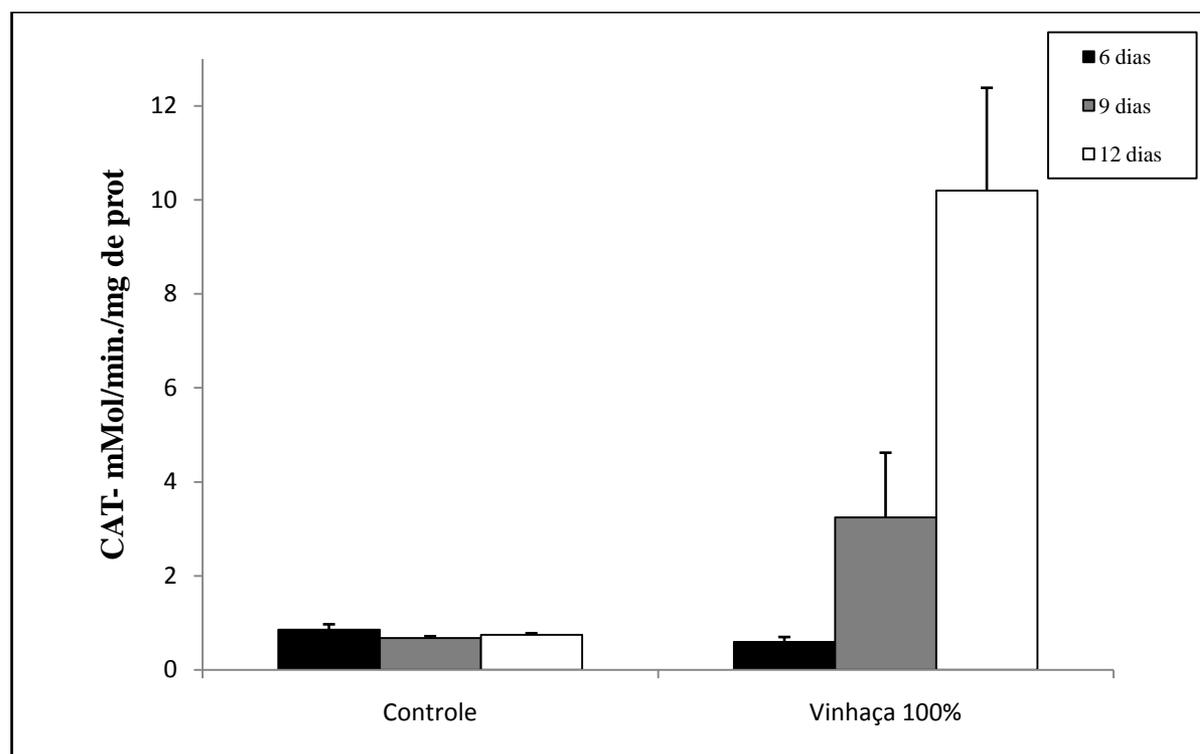


Figura 18 – Atividade em espectrofotômetro de catalase de *P. sajor-caju* sobre meio controle e vinhaça 100% durante 6, 9 e 12 dias de crescimento

Foi verificado intenso aumento da atividade da CAT nos períodos de 6, 9 e 12 dias de crescimento sobre vinhaça em relação ao controle, indicando um provável aumento da produção de H_2O_2 nessa condição, o que refletiu na elevação da atividade enzimática. O estresse oxidativo observado na presença da vinhaça 100% pode ser causado pela particularidade do meio na escassez nutricional, bem como pela presença de compostos recalcitrantes e dos produtos de degradação por enzimas ligninolíticas.

A detoxificação do H_2O_2 pela CAT é de extrema importância no sistema antioxidativo. Foi demonstrado em fungos filamentosos, que há mais de um gene para a enzima CAT, sendo que, dois genes (*catA* e *catB*) foram inicialmente caracterizados em *A. nidulans* (KAWASAKI et al.,

1997), sendo que é possível a existência de um terceiro (*catC*). Entretanto, Kawasaki e Aguirre (2001) mostraram que um mutante para os três genes ainda era capaz de crescer normalmente quando exposto a compostos geradores de H_2O_2 , fornecendo evidências para um quarto gene, *catD*.

Entre os diferentes genes para a enzima catalase, foi demonstrado que há expressão diferencial dependendo da fase de crescimento ou causa de estresse oxidativo. O gene *catB*, por exemplo, é expresso somente no micélio vegetativo ou em *A. nidulans* quando exposto ao H_2O_2 , paraquat, choque térmico e ácido úrico. Por outro lado, o gene *catD* pode ser induzido pela falta de glicose na fase estacionária de crescimento, em temperaturas elevadas e em menor nível, também pelo H_2O_2 (KAWASAKI; AGUIRRE, 2001).

Azevedo et al. (2007) relataram que o fungo aquático *Heliscus submersus* tem a CAT como principal mecanismo antioxidativo contra o metal cobre. Neste artigo, os autores relatam que a atividade da SOD apresentou elevação quando exposto ao estresse agudo causado pelo metal, no entanto, em concentrações elevadas e tempos prolongados de exposição, foi observada a inibição desta enzima. Porém a atividade da CAT apresentou comportamento distinto quanto a presença do metal, uma vez que esta enzima se elevou com o aumento da concentração do metal, e não sofreu inibição nem mesmo nas concentrações altas de cobre testadas. Segundo os autores, essa característica faz com que este fungo, isolado de águas poluídas, seja mais tolerante a metais do que *Varicosporium elodeae*, fungo aquático isolado de águas limpas, e que apresentou elevação menos pronunciada da atividade de CAT.

4.5.4 Atividade de GR em espectrofotômetro e em PAGE não-desnaturante.

O sistema antioxidante é composto por enzimas e compostos não-enzimáticos que atuam contra o estresse oxidativo. A manutenção do estado redox do citoplasma é uma condição importante para a vida da célula, sendo que a enzima glutationa-redutase (GR), bem como a glutationa peroxidase (GPx), têm papel fundamental na manutenção desta homeostase. Esse sistema catalisa a transformação do H_2O_2 em água, sendo que a glutationa opera em ciclos entre sua forma oxidada (GSSH) e sua forma reduzida (GSH). A GSH reduz o H_2O_2 a água na presença da GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSSH é regenerada pela GR (APEL; HIRT, 2004).

Além de participar de processos de detoxificação celular de EAOs, a GSH pode reagir enzimaticamente através da ação da glutathiona-S-transferase (GST) ou de forma espontânea com diversos compostos, tais como metais e outros xenobióticos formando conjugados de GSH (APEL; HIRT, 2004).

Os resultados provenientes da determinação da atividade GR, demonstraram que esta via antioxidativa não é afetada pelo crescimento do fungo em vinhaça 100% nos diferentes períodos de crescimento. No entanto, a atividade da GR no meio controle apresentou tendência de aumento gradativo da atividade enzimática quanto maior o tempo de crescimento do microrganismo (Figura 19). O comportamento observado da atividade da GR no meio com vinhaça pode indicar que o fungo apresenta outras vias metabólicas (enzimas antioxidantes) para atuar nos compostos recalcitrantes presentes na vinhaça (FIALHO, 2008).

Já os resultados provenientes da determinação da atividade GR em PAGE nativo (Figura 20) mostraram diferenças entre os tratamentos em relação ao número de isoformas encontradas. Foi observada a indução de diferentes isoformas de GR nos diferentes períodos de crescimento em vinhaça, havendo um aumento de número de isoformas relacionadas ao tempo de exposição do fungo a vinhaça. Porém, a indução de novas isoformas de GR não refletiu no aumento da atividade total da enzima (Figura 19).

Ao analisar a enzima GR no meio controle, a atividade em PAGE reflete o aumento da atividade total encontrada nos períodos de 6, 9 e 12 dias de leitura, uma vez que a intensidade das bandas em PAGE também aumenta na mesma tendência.

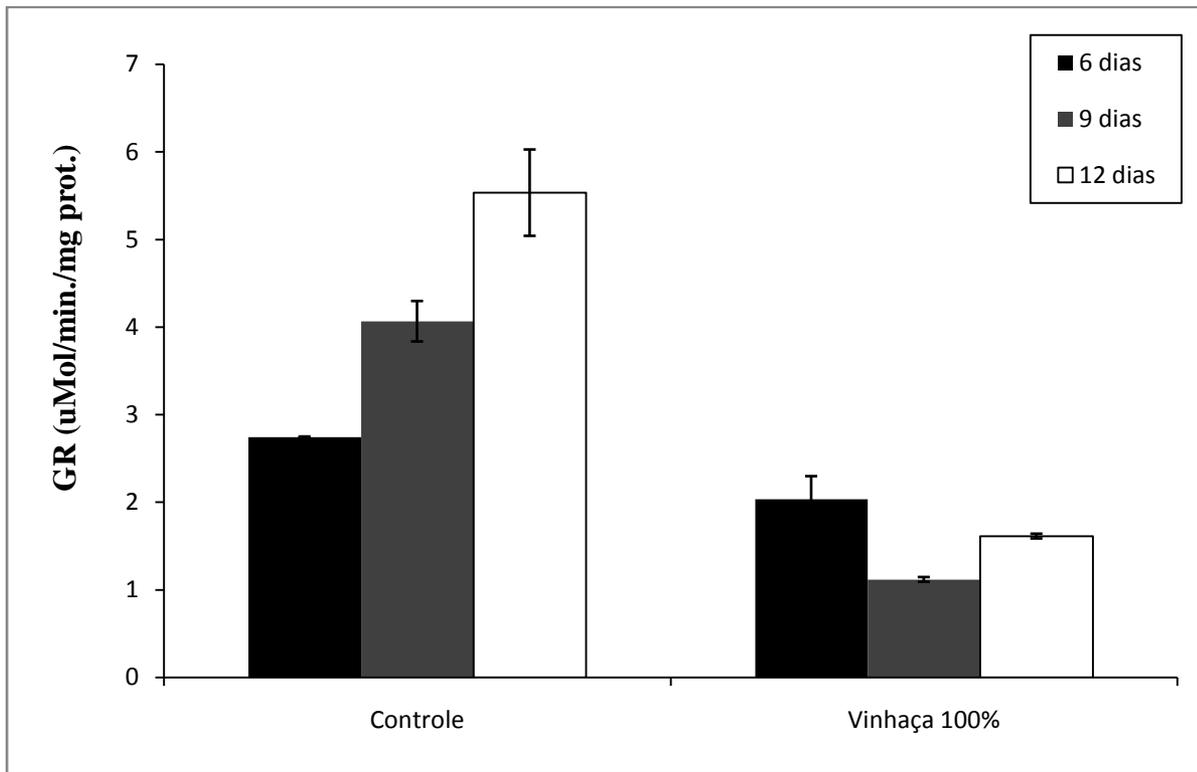


Figura 19 - Atividade em espectrofotômetro de glutathione reductase de *P. sajor-caju* sobre meio controle e vinhaça 100% durante 6, 9 e 12 dias de crescimento

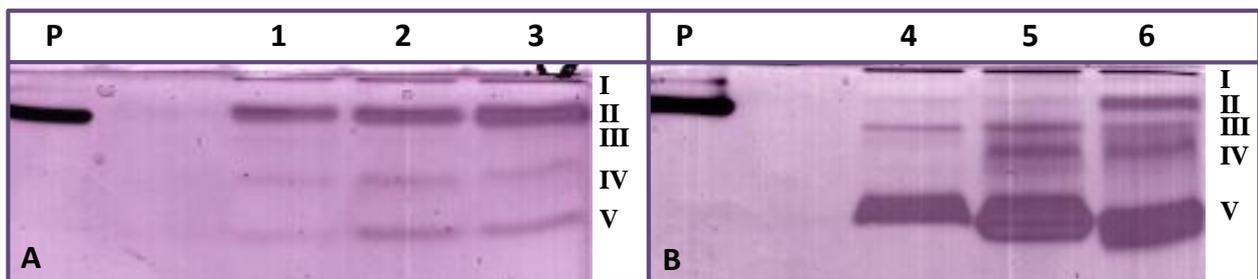


Figura 20 – Gel de atividade da enzima GR em PAGE não-desnaturante. Padrão (P) de GR de fígado bovino; 1, 2 e 3 representam 6, 9 e 12 dias de crescimento de *P. sajor-caju* 020 em MSF (Meio Sintético para Fungos) e 4, 5 e 6 representam 6, 9 e 12 dias de crescimento do fungo no meio com vinhaça 100%

Em resposta ao estresse produzido pela vinhaça, outro sistema que não o da glutathiona pode estar sendo utilizado. Uma via complexa constituída por tioredoxinas, a qual funciona em paralelo ao da glutathiona, também poderia ser importante para a manutenção do equilíbrio GSH/GSSH por *P. sajor-caju* 020.

Estudos sobre a via da glutathiona envolvendo fungos filamentosos são escassos e os resultados não são claros ou contraditórios quando comparados aos estudos com leveduras (LI; MCNEIL; HARVEY, 2008). Foi demonstrado em *A. niger* que a GPx, enzima pertencente ao ciclo da glutathiona, não é importante na defesa contra o estresse oxidativo (BAI; HARVEY, MCNEIL, 2003). Em *Penicillium chrysogenum*, a atividade da GPx, GR e o ciclo da glutathiona foram induzidos por altas concentrações de H₂O₂ exógeno, no entanto, a concentração de GSH teve fraco aumento, enquanto GSSH aumentou significativamente resultando no desequilíbrio da homeostase da glutathiona (EMRI; POCSI; SZENTIRMAI, 1997).

Os resultados demonstram que *P. sajor-caju* 020 possui as enzimas SOD, CAT, GR em condições fisiológicas normais, assim como foi observado por Fialho (2008) sobre os efeitos de uma mistura artificial de voláteis no fungo *Guignardia citricarpa* em três períodos diferente (24, 48 e 72 h). Nesta situação, os mecanismos de defesa antioxidativos são certamente adequados para o reparo de danos celulares e manutenção das EAOs em um nível basal não destrutivo (ANGELOVA et al., 2005). O aumento na atividade da SOD e CAT fornece indicativos de que a vinhaça desencadeou a formação de O[•] e H₂O₂, já que aquelas enzimas são diretamente responsáveis pela eliminação dessas EAOs.

Mesmo tendo sido observado uma resposta inicial da SOD e CAT frente a possível geração de EAOs provocada pelo crescimento de *P. sajor-caju* em vinhaça, o fungo não tem o seu crescimento inibido pelos compostos recalcitrantes e fenóis presentes na vinhaça. Isso pode ocorrer devido à capacidade do basidiomiceto em manter a defesa antioxidativa, de tal modo que mantenha a homeostase sobre as conseqüências do acúmulo intracelular de EAOs. Esse fato foi verificado no presente trabalho, uma vez que houve aumento da atividade da CAT em períodos superiores a 6 dias de crescimento em vinhaça, evitando assim o acúmulo intracelular de H₂O₂.

Outra via antioxidativa, o da glutathiona, que também tem um papel importante na detoxificação de EAOs, entre elas o H₂O₂, parece não ter sido ativada durante o crescimento do basidiomiceto sobre a vinhaça. Além disso, a interferência dos compostos presentes na vinhaça em outros processos celulares importantes pode refletir por conseqüência no decréscimo da

atividade antioxidativa, após uma resposta de defesa inicial. Isso é reforçado pelos dados que mostram a diminuição na síntese de proteínas (Figura 15), já que a concentração de proteínas por grama de micélio sofreu decréscimo quando o fungo foi crescido em um tempo mais prolongado sobre o resíduo (12 dias). Entretanto, vale observar, que a vinhaça induz a síntese de diferentes enzimas antioxidantes no caso da GR nos diferentes períodos estudados sobre o resíduo, podendo-se observar um aumento da intensidade de um padrão diferente de GRs quando comparado com o meio controle, o que indica a capacidade do fungo de suportar EAOs quando submetidos a longos períodos de crescimento sobre vinhaça (Figura 20).

O tratamento com ciclohexamida impediu a adaptação de *A. niger* a altas concentrações de H_2O_2 , via pré-exposição à baixa concentração desse agente estressante (LI; MCNEIL; HARVEY, 2008). O composto também impediu o aumento da atividade da SOD e CAT em diversos fungos, indicando que a síntese protéica de novo é requerida para a indução de enzimas antioxidantes em condições de estresse (ANGELOVA et al., 2005). Os mesmos autores também verificaram que a redução na atividade antioxidante causada pela inibição da síntese de proteínas elevou em três vezes o dano oxidativo de proteínas intracelulares.

Embora a resposta antioxidativa tenha sido extensivamente estudada, principalmente em procariotos, além de leveduras, células animais e vegetais, informações relacionadas a fungos filamentosos ainda são muito fragmentadas, sendo a maior parte dos estudos desenvolvidos em *N. crassa* e *A. niger* (ANGELOVA et al., 2005). Sabe-se que as respostas podem variar de acordo com o microrganismo, concentração e natureza do agente causador do estresse, condições de cultivo, idade da cultura entre outros fatores diversos. Além disso, não existem trabalhos anteriores relatando o efeito da vinhaça na atividade de enzimas antioxidativas (FIALHO, 2008).

4.6 Toxicidade de vinhaça 100% e vinhaça tratada com o fungo *P. sajor-caju* e análise de redundância (RDA)

4.6.1 Toxicidade segundo o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber

A toxicidade da vinhaça 100% foi diminuída para todos os organismos testados após o tratamento com *P. sajor-caju*. Foram calculados: as concentrações que inibem o crescimento (IC),

ou a concentração letal (CL), ou a que inicia os efeitos tóxicos, denominada concentração efetiva (CE), lembrando que quanto menor a concentração, maior é o efeito tóxico da substância teste para o organismo exposto.

Nos testes com *P. subcapitata*, a vinhaça 100% apresentou toxicidade elevada (1,58%) quando comparada com a vinhaça tratada (14,91%), a toxicidade diminuiu ceca de 9,4 vezes (Tabela 5). As partículas em suspensão presentes na vinhaça 100% podem ter inibido a reprodução das algas, pela ausência de luz, assim como pode ter se dado pela presença de compostos de alto peso molecular, principalmente melanoidinas, com 70-80% de todo peso das substâncias coloridas de maior peso molecular, sendo estas frequentemente tóxicas para os microrganismos propícios aos biotratamentos de efluentes (PÉREZ et al., 2006).

Para os testes realizados com *H. attenuata* foi possível analisar dois parâmetros, a concentração efetiva (CE₅₀) e letal (CL₅₀) que causa efeito na morfologia em 50% dos organismos ou mortalidade dos mesmos, sendo possível notar uma redução do efeito tóxico da amostra que foi submetida ao tratamento com o basidiomiceto de aproximadamente de 7,9 e 5,9, respectivamente (Tabela 5).

No caso do organismo *D. magna* foi observado uma grande diferença de toxicidade entre a vinhaça tratada (65,95%) e a 100% (3,59%) mostrando a intensa redução do potencial tóxico (18,4 vezes), provocado pelos compostos da vinhaça e por uma elevada DBO e DQO (FREIRE, CORTEZ, 2000), assim como pode ser observado no presente trabalho (Tabela 4). *D. similis* apresentou uma toxidez de 21,02% quando submetida ao tratamento utilizando vinhaça pura e 2,21% com o resíduo tratado, com redução de 9,5 vezes pelo tratamento com o fungo (Tabela 5). Portanto *D. similis* se mostrou mais sensível aos compostos presentes na vinhaça que *D. magna*. Esta diferença em sensibilidade também foi encontrada por Messias (2008). E o organismo, dos testados, menos sensível a vinhaça foi *D. magna*.

Tabela 5 - Valores de CI_{50} para *P. subcapitata*, CE_{50} e CL_{50} para *H. attenuata* e CL_{50} para *D. magna* e *D. similis*

Tratamentos	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. magna</i>	<i>D. similis</i>	<i>H. attenuata</i>	
	CI_{50}	CL_{50}	CL_{50}	CL_{50}	CE_{50}
Vinhaça pura (100%)	1,58	3,59	2,21	2,25	2,05
Vinhaça tratada	14,91	65,95	21,02	17,68	12,03

Os valores são expressos em porcentagem (%)

4.6.2 Toxicidade da vinhaça pela análise de redundância (RDA)

No método estatístico Trimmed Spearman-Kärber realizado para determinação do CE_{50} , CI_{50} e CL_{50} , mostra um índice “ending points” de toxicidade que está diretamente relacionado com a concentração da amostra necessária para causar efeitos tóxicos nos organismos, sendo possível a comparação entre os organismos. As respostas das análises estatísticas de redundância (RDA) apresentam-se de forma semelhante, no entanto foi possível analisar cada uma das concentrações das amostras estudadas isoladamente. A posição das variáveis apontadas pelas setas indica o grau de importância e influência desta na toxicidade, ou seja, quanto mais distante a variável ambiental estiver das amostras, o potencial de toxicidade destas se mostra menos efetivo (Figura 21). A angulação das setas indica o seu grau de importância. A menor distância entre as setas, que representam as variáveis ambientais indica a influência do primeiro sobre o segundo fator.

Para *H. attenuata*, *D. magna*, *D. similis* e *P. subcapitata* as concentrações de 1,56, 3,125, 6,25% da vinhaça tratada (VT) mostraram elevada redução da sua toxicidade, ao passo que apenas 1,56% da amostra de vinhaça pura (VP) apresentou real característica de toxicidade. A VT (12,5, 25 e 50%) apresentou toxicidade mais elevada quando comparado com as amostras de menor concentração, entretanto a VP 3,125% é a única amostra que apresenta toxicidade intermediária, seguido pela VP 6,25%. Apenas VT 100% foi extremamente tóxico para os organismos testados, juntamente com as amostras VP 12,5, 25, 50 e 100%. *D. magna* mostrou ser menos sensível que os outros organismos, comprovando os “ending points” encontrados pelo teste estatístico. A análise

mostra que essa toxicidade se deu principalmente pela presença da matéria orgânica e compostos de alto peso molecular presente na vinhaça (NAIK et al, 2008) (Figura 21).

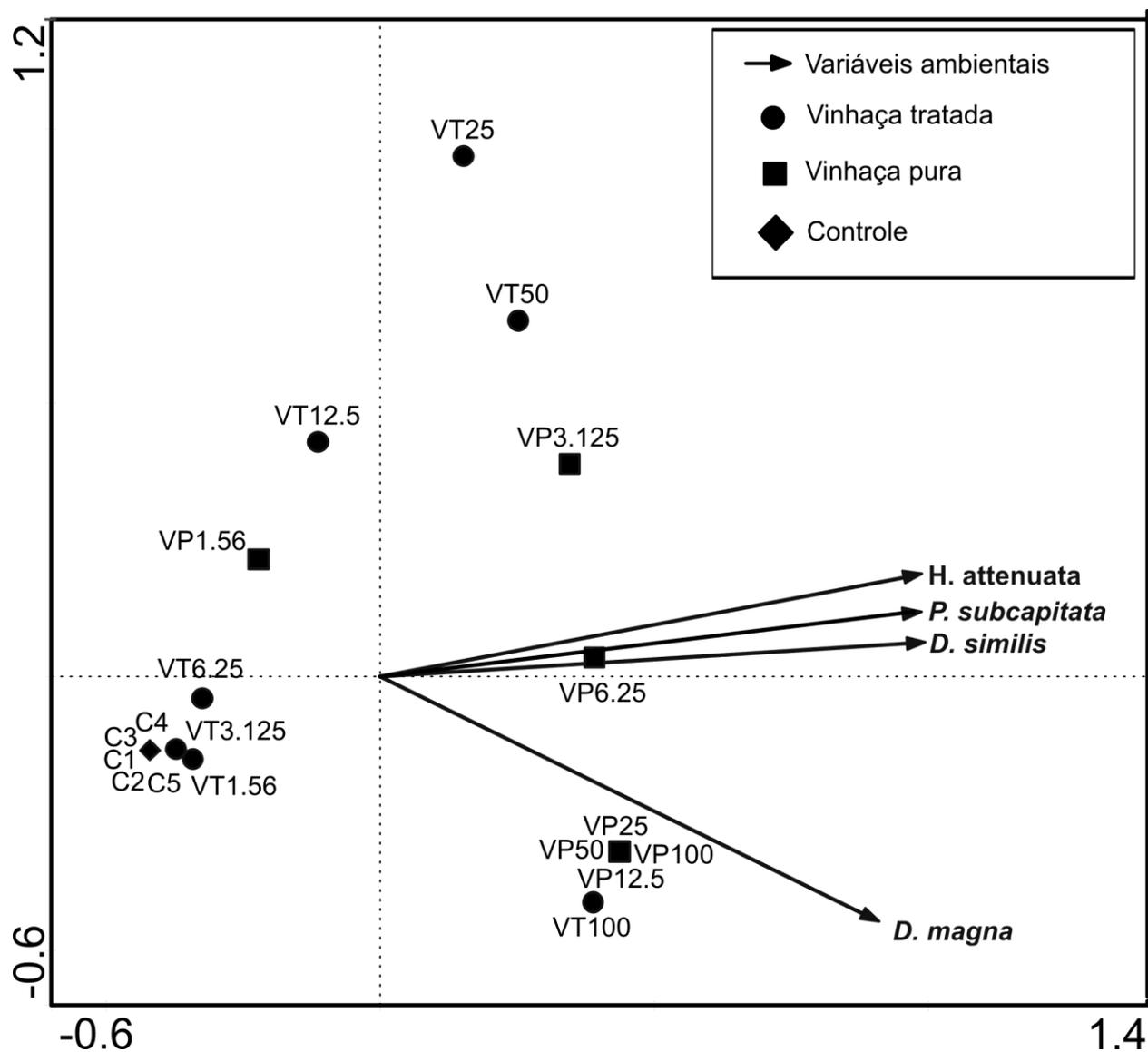


Figura 21 - Análise de redundância (RDA) com os organismos *H. attenuata*, *P. subcapitata*, *D. magna* e *D. similis* para as concentrações de vinhaça (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56%) das amostras vinhaça tratada (VT) e vinhaça pura (100%) (VP)

A disposição de vinhaça no ambiente apresenta alto potencial poluidor. A alta demanda química de oxigênio, nitrogênio total e fósforo total presentes neste efluente podem resultar na

eutrofização dos corpos de água (KUMAR et al., 1997). Os componentes de grande cor da vinhaça reduzem a penetração da luz nos rios, lagos e lagoas, que por sua vez diminui tanto a atividade fotossintética quanto a concentração de oxigênio dissolvido, afetando com isso a vida aquática. Kumar et al. (1995) avaliaram o efeito tóxico do efluente de destilarias de cana-de-açúcar em peixes da espécie *Lesbistes reticulates* (Lebistes) e observaram mudanças no comportamento variando com a concentração do efluente. Kumar e Gopal (2001) relataram alterações hematológicas do peixe *Channa punctatus* (catfish) exposto ao mesmo efluente. Saxena e Chauhan (2003) investigaram a influência do resíduo agroindustrial sobre o consumo de oxigênio em águas frescas com o peixe *Labeo rohita* e observou que a presença de sais orgânicos e inorgânicos presentes no efluente interferiu no sistema respiratório do peixe. A coagulação na mucosa das brânquias (guelras) reduziu o consumo de oxigênio dissolvido causando asfixia.

Matkar e Gangotri (2003) observaram a toxicidade do efluente dependente da sua concentração sobre caranguejos da espécie *Barythephusa guerini*. O impacto do resíduo agroindustrial sobre o metabolismo de carboidratos de *Cyprinus carpio* foi estudado por Ramakritinan et al. (2005). O estresse devido à presença do efluente causou uma disfunção no processo respiratório, resultando em anaerobiose a nível dos órgãos durante uma intoxicação subletal.

A disposição de vinhaça sobre a terra é igualmente danosa para a vegetação. Foi relatado que o resíduo reduz a alcalinidade do solo e a disponibilidade de manganês, inibindo a germinação de sementes (KUMAR et al., 1997). Kannan e Upreti (2008) relatam os efeitos altamente tóxicos da vinhaça sobre o crescimento e germinação de sementes de *Vigna radiata* em baixas concentrações do resíduo (5% v/v). Houve a perda de proteínas e carboidratos das sementes, além de ser observado um decréscimo na atividade de enzimas importantes como a fosfatase alcalina e ATPase.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Estudando o uso de meio seletivo para verificar a produção de ligninases, foi possível identificar atividades nos fungos basidiomicetos e o ascomiceto *T. reesei*, não sendo detectadas em *A. niger* e *M. pusillus*. O crescimento dos fungos sobre diversas concentrações de vinhaça (25, 50 e 100%), e avaliando a descoloração, com a possível degradação da molécula de melanoidina foi selecionado o basidiomiceto *P. sajor-caju* CCB 020 com potencial para descoloração de vinhaça.
- A produção de biomassa de *P. sajor-caju* em fermentação submersa com vinhaça e, vinhaça suplementada com extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato de potássio monobásico, mostrou que os meios suplementados não diferiram estatisticamente entre eles, e diferiram do meio contendo vinhaça 100%, o que evidencia a vinhaça como meio adequado para o crescimento do fungo.
- Na produção de enzimas lacase e MnP em meio com vinhaça, vinhaça suplementada com glicose 2% e em meio sintético para fungos (MSF), não foi observada diferença significativa no padrão de atividade lignolítica.
- A descoloração da vinhaça foi diretamente relacionada a atividade de lacase. A turbidez apresentou atuação inversa com o aumento da taxa de descoloração, indicando o uso de matéria orgânica (observado pela redução de 75,3% da DBO e 82,8% da DQO) pelo fungo. A produção das enzimas responsáveis pela descoloração em 99% e diminuição da turbidez em 99% foram concomitantes com o aumento da biomassa de *P. sajor-caju*.
- O estudo das atividades das enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GR mostrou que a vinhaça é um meio estressante para *P. sajor-caju* e este mantém a homeostase mediante ao ataque celular pelas EAOs induzidas pela degradação de vinhaça. Este aumento na atividade de enzimas foi observado por análise em PAGE não-desnaturante para SOD e GR, em espectrofotômetro para CAT e GR, sendo esta última com atividade diferencial entre os dias estudados e menores quando comparado ao meio controle.
- A avaliação da toxicidade à vinhaça e vinhaça tratada por bioensaios com os organismos *P. subcapitata*, *H. attenuata*, *D. magna* e *D. similis* mostrou redução da toxicidade do meio após o tratamento com *P. sajor-caju*. A diminuição da toxicidade foi de 9,4 vezes para *P. subcapitata*, 7,9 e 5,9 vezes para as concentrações efetiva e letal para *H. attenuata*, e para *D.*

magna e *D. similis*, 18,4 e 9,5 vezes, respectivamente. Diferentes concentrações de vinhaça, avaliada por Análise de Redundância mostrou que a vinhaça tratada apresentou redução de toxicidade progressiva com a diluição.

- Todos organismos testados mostraram-se eficientes para testar a toxicidade da vinhaça, respondendo com coerência as diluições. *D. similis* se mostrou mais sensível que *D. magna* e quando comparado aos demais organismos testados. O organismo menos sensível foi *D.magna*.
- *P. sajour-caju* CCB 020 se mostrou como uma linhagem apropriada para o tratamento da vinhaça, produzindo biomassa de qualidade nutritiva, e alta atividade enzimática de lacases, MnP, e àquelas relacionadas a destoxificação celular, melhorando a qualidade em termos de pH e elementos dissolvidos.
- Como etapas futuras, sugerimos aplicar o cultivo em maior escala para aplicação industrial, aproveitando que a vinhaça é um efluente esterilizado no processo de formação e o desenvolvimento atual de fermentadores aeróbios.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso do sistema vinhaça e *P. sajor-caju* CCB 020 pode se aplicado em processos de remoção de cor e na degradação de compostos complexos como da vinhaça, ocorrendo destoxificação e melhora na sua qualidade podendo ser indicada como água de reuso.

A vinhaça 100% mostrou-se adequada para produção de enzimas de interesse biotecnológico ambiental, como a lacase e a manganês peroxidase viabilizando a produção a partir de um resíduo de fácil acesso, disponível, baixo custo e já esterilizado pelo processo de formação.

Sendo uma espécie comestível, a biomassa pode ser aproveitada em manufaturas de rações ou alimentação ou extração de produtos de interesse comercial.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR FILHO, J. M. M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agonomia, área de concentração: Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2008.
- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- AHN, M.Y., DEC, J., KIM, J.E.; BOLLAG, J.M. Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 1509-1515, 2002.
- AITKEN, M.D; IRVINE, R.L. Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of biochemistry and biophysics**, Orlando, v. 276, n. 2, p. 405–414, 1990.
- AKHMEDOVA, Z. R. Cellulolytic, xylanolytic, and lignolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 30, n° 1, p. 32-37, 1994.
- ALCSHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCZE, A.; LEADER, H. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 438, p. 195- 200, 1998.
- AMJED, M.; JUNG, H.G.; DONKER, J.D. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, p. 2877-2884, 1992.
- ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; SWAMINATHAN, K. Biotreatment of distillery effluent using *Aspergillus niveus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 70, n. 2, p. 268–277, 2003.
- ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 26, p. 544-549, 2000.
- ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SPASOVA, B.K.; VASSILEV, S.V. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycology Research**, London, v.109, p.150-158, 2005.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARAUCO, L. R. R. **Efeito da presença de sedimento na Toxicidade Aguda do Sulfato de Cobre e do Triclorfon para três espécies de Daphnia**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Centro de Estudos Ambientais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.

ARCHIBALD, F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 58, n. 9, p. 3110–3116. 1992.

ARENZON, A. **Ensaio ecotoxicológicos no monitoramento da qualidade de águas subterrâneas potencialmente impactadas**. 2004. 94 f. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

ARAFAT, S.; YASSEN, A.E. (2002). Agronomic evaluation of fertilizing efficiency of vinasse. **In: Transactions of the World Congress of Soil Science**, 14-21 August 2002, Bangkok, Thailand. v.2, p. 474, 1991- 6 p.

ARKHIPCHUK, V. V.; BALISE, C.; MALINOVSKAYA, M. V. Use of hydra for chronic toxicity assessment of waters intended for human consumption. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 142, p. 200-211, 2006.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima Editora, 2003. 340 p.

AZEVEDO, M. M.; CARVALHO, A.; PASCOAL, C.; RODRIGUES, F.; CÁSSIO, F. Responses of antioxidant defenses to Cu and Zn stress in two aquatic fungi. **Science of The Total Environment**, Shannon, v. 377, p. 233-243, 2007.

AZEVEDO, R.A. ; ALAS, R.M. ; SMITH, R.J. ; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.

BAI, Z.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus Níger* B1-D. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 83, p. 772-779, 2003

BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.89, p. 141-145, 2001.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, Iowa, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.

BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.

BERGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.13, p.25-58, 1994.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBUR, D.; BURA, R.; MARKOV, A.; SKOMAROVSKY, A.; OKUNEV, O.; GUSAKOV, A.; MAXIMENKO, V.; GREGG, D.; SINITSYN, A.; SADDLER, J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.37, n.2, p.175-184, 2005.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K.; Biodegradation of cellulose materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microbiology and Technology**, New York, v. 3, p. 90-104, 1984.

BLAISE, C.; FÉRARD, J. F. (Ed). **Small-scale freshwater toxicity investigations**. V. 1. Toxicity test methods. Dordrecht: Springer Science, 2005. 551 p.

BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Journal of Environmental Toxicology**, New York, v. 15, p. 352-359, 2000.

BOISSET, C.; FRASCHINI, C.; SCHULEIN, M.; HENRISSAT, B.; CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.66, p.1444-1452, 2000.

BOLLAG, J.M.; CHU, H.L.; RAO, M.A.; GIANFREDA, L. Enzymatic Oxidative Transformation of Chlorophenol Mixtures. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 63-69, 2003.

BOLLAG, J.M.; SHUTTLEWORTH, K.L.; ANDERSON, D.H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 54, p. 3086-3091, 1988.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 267, p. 99-102, 1990.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; FREIERMUTH, B.; BODIE, E.; BORNEMANN, S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4627-4632, 1996.

BOURBONNAIS, R; PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 255, p. 445-450, 1988.

BOWLER, C; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BOYLE, C.D.; KROPP, B.R.; REID, I.D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, p. 3217-3224, 1992.

BREZNAK J.; BRUNE A. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 453-487, 1994.

BROWN, M.A.; ZHAO, Z.; MAUK, A.G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. **Inorganica Chimica Acta**, New York, v. 331, p. 232-238, 2002.

BUMPUS, J.A. 1993. White-Rot Fungi and Their Potential Use in Soil Bioremediation Process. *In: Soil Biochemistry*. BOLLAG, J.M.; STATZKIM, G. (Eds.). New York. Marcel Dekker Inc, p. 65-100.

BUMPUS, J.A. Microbial degradation of azo dyes. In: SINGH, V.P. **Biotransformations: microbial degradation of health risk compounds**. New York: Elsevier Science, 1995. p. 157-177.

BURDEN, D., WHITNEY, D. **Biotechnology: proteins to PCR – a course in strategies and lab techniques**. Boston, 1995.

CABISCOL, E.; PIULATS, E.; ECHAVE, P.; HERRERO, E.; ROS, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 27393-27398, 2000.

CALERA, J.A.; SANCHES-WEATHERBY, J.; LOPES-MEDRANO, R.; LEAL, F. Distinctive properties of the Catalase B of *A. nudulans*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.475, p.117-120, 2000.

CALL, H.P.; MUCKE, I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®- process). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, p. 163-202, 1997.

CAMERON, M.D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUST, S.D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 54, p. 751-758, 2000.

CARASCHI, J.C. **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivatização de polpa de bagaço de canade-açúcar**. 1997. 188p. (Doutorado em Física) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 29, p. 473-477, 2001.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Degradable polymers. **Progress in Polymer Science**, Pittsburgh, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. A new look at cultivated mushrooms. **Bioscience**, Washington, v.34, n. 6, p. 358-362, 1984.

CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC Press, 1989.

CHARY, P., et al., SOD 1 null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. **Genetics**, Bethesda, v.157, p.723-730 1994.

CHEFETZ, B., CHEN, Y.; HADAR, Y.. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3175-3179, 1998.

CHENG, C.; TSUKAGOSHI, N.; UDAKA, S. Nucleotide sequence of the cellobiohydrolase gene from *Trichoderma viride*. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, n. 18, p.5559, 1990.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, New York, v. 35, p. 93-96, 2004.

CLEMENTE, A.R.; DURRANT, L.R. **Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos po fungos ligninolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus* **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 58, p.5 82–594, 2002.

COLLINS, P.; DOBSON, A.D.W.; FIELD, J.A. 1998. Reduction of the 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 6, p. 2026-2031, 1998.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 10 dez. 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Vinhaça**: Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo: CETESB, 2005, p. 1-12. (P4.231).

COULIBALY, L.; GERMAIN, G.; SPIROS, A. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 620–630, 2003.

CRECCHIO, C.; RUGGIERO, P.; PIZZIGALLO, M. D. R. Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 48, p. 585-591, 1995.

D'ACUNZO, F.; GALLI, C.; MASCI, B. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems Solubility and steric issues. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 269, p. 5330-5335, 2002.

DAS, N; SENGUPTA, S; MUKHERJEE M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4120-4122, 1997.

DELLAMATRICE, P.M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP**. 2005. 137p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R.; KAMIDA, H. M.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; Blaise, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

DITTMER, J. K.; PATEL, N. J.; DHAWALE, S. W.; DHAWALE, S. S. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete crysosporium* grown under nutrient sufficiency. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 149, p. 65-70, 1997.

DOELLE, H.W. Joint venture capital investment for clean technologies and their problems in developing countries. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.12, n. 5, p. 445-450, 1996.

DOERGE, D.R.; DIVI, R.L.; CHURCHWELL, M.I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 250, p. 10-17, 1997.

DUPONT, R.R., BRUELL, C.J., MARLEY, M.C., DOWNEY, D.C., NORRIS, R.D., HULLING, S.G.; PIVETS, B. 1997. **Bioremediation**. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. 596p.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**, Jaguariúna: CNPM/EMBRAPA, 1997. p. 269-292.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.

- DUTKA, B. J. **Methods for microbiological and toxicological analysis of water, wastewaters and sediments**. Ottawa: National Water Research Institute (NWRI), Environmental Canada, 1997. 317 p.
- EGGEN, T. **Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi**. (Doctor Scientiarum Theses) Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway, 2000.
- EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J.F.D.; ERIKSSON, K.E.L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 391, p. 144-148, 1996a.
- ELISASHVILI, V.L.; Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 29, p. 257-266, 1993.
- ENARI, T. M. Microbial lipases. _____. **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Applied Science Publishers, 1983.
- ENGUIA, F.J.; MARTINS, L.O.; HENRIQUES, A.O.; CARRONDO, M.A. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 21, p. 19416-19425, 2003.
- EMRI, T.; POCSI, I.; SZENTIRMAI, A. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 23, p. 809-814, 1997.
- ERIKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, New York, v.24, p.79-101, 1990.
- ERIKSSON, K.E.; PETTERSSON, B. Endo-1,4- β -glucosidase of *Sporotrichum pulverulentum*. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.160, p.368-382, 1988.
- ERLO, L.F. **Respostas enzimáticas da linhagem superior CadG1 de *Aspergillus* sp. A exposição ao Cd**. 2006. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- FAGERSTAM, L.G.; PETTESSON L.G. The 1,4- β -glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM9414. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 97–101, 1980.
- FÄHRAEUS, G. Aromatic compounds as growth substances for laccase producing rot fungi. **Physiology Plant**, Urbana, v.15, p.572–579, 1962.
- FASANELLA, C.C. **Ação de enzimas lignocelulolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80p: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica**. Caxias do Sul: Educs. 2004. 510p.

FERRAZ, A.L.; PARRA, C.; FREER, J.; BAEZA, J.; RODRÍGUEZ, J.; Characterization of white zones produced on *Pinus radiata* wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 641-645, 2000.

FERREIRA, A.; HANNA, R. K.; LEBRÃO, G. W.; LEBRÃO, S. M. G.; NAGASHI, L.; SU, M. T.; VICENTINI T. Avaliação de compósito de poliéster e fibra de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: s. ed. 2006.

FIALHO, M. B. **Mecanismos de ação de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da ponta preta dos citros**. 2008. 120 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2008.

FLACHNER, B.; RÉCZEY, K. β -glucosidase production and characterization of some *Aspergillus* strains. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v.18, n.3, p.303-307, 2004.

FONSECA, G. P. S. **Análise da poluição difusa na bacia do rio Teles Pires com técnicas de geoprocessamento**. 2006. 171 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Humanas e Animais, Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2006.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 92, p. 696-717, 1994.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, p. 241-254, 1997.

FRAGOEIRO, S.; MAGAN, N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **Environmental Microbiology**, New York, v. 7, n. 3, p. 348, 2005.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. (Série Engenharia Agrícola, 1).

FRUGOLI, J.A.; ZONGH, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

- FUJIAN, X.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 80, p. 149-151, 2001.
- FUJII, T.; HAMAOKA, R.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.123-130, 2000.
- GALLIANO, H.; GAS, G.; SERIS, J.L.; BOUDET, A.M. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 13, p. 478-482, 1991.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J.M. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. **Soil Science. Society of America Journal**, Madison, v. 58, p. 1672-1681, 1994.
- GIL-AD, N.L.; BAR-NUN, N.; NOY, T.; MAYER, A.M. Enzymes of *Botrytes cinerea* capable of breaking down hydrogen peroxide. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.190, p.121-126, 2000.
- GLENN, J.K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M.H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 251, p. 688-696, 1986.
- GOKARN, A.N.; MAYADEVI, S. Active charcoal from agro-waste for colour removal of treated spentwash. In: Annual Convention of D.S.T.A., 2000. Pune. **Proceedings...** Pune, 2000. Part 1, p. B1-B10.
- GOKARN, A.N.; SAPKAL, N.V.; JOSHI, A.P.; DONGARE, M.K. Towards customer friendly process for the treatment of distillery effluent. In: Annual Convention of D.S.T.A., 1998. Pune. **Proceedings...** Pune, 1998. Part 1, p. B4-B5.
- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 57, n. 3, p. 605-622, 1993.
- GONG, C.S.; TSAO, G.T.; Cellulase and biosynthesis regulation. **Annual Reports on Fermentation Processes**, New York, v. 3, p. 111-139, 1975.
- GONZALES, L.; HERNÁNDEZ, J.R.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by lacase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoideum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 30, p. 474-481, 2002.

- GOSZCZNSKI, S.; PASZCZYNSKI, A.; PASTI-GRIGSBY, M. B.; CRAWFORD, R. L.; CRAWFORD, D. L. New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 1339-1347, 1994.
- GRGIC, I.; PERDIH, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production in *Phanerochaete chrysosporium* by polyxyalkanes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p.360-368, 2003.
- GROSS, D.; COOMBS, J. Enzymic colour formation in beet and cane juices. **International Sugar Journal**, London, v. 928, p. 69-106, 1976.
- GUELFY, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.L.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v. 49, p. 63-73, 2003.
- GUGLIOTTA, A.M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: BONONI, V.L.R. (Org.). **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, Instituto de Botânica, São Paulo, 1998,184 p.
- GUIDOT, D.M. et al., Absence of electron transport restores growth of Mn-SOD-deficient *S. cerevisiae* in hyperoxia. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v268, p.26699-703, 1993.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W.C. **Multivariate data analysis**. 4 ed th. New Jersey: Prentice Hall, 1995.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, Iowa, v. 12, p. 417, 1978.
- HAMMEL, K.E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. **New Journal of Chemistry**, London, v. 20, p. 195-198, 1996.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by (pathogenic and saprophytic) fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HAQ, IKRAM-UL.; JAVED, M.M.; KHAN, T. S. Sugar cane bagasse pretreatment: An attempt to enhance the production potential of cellulases by *Humicola insolens* TAS-13. **Biokemistri**, Ilorin, v. 18, n. 2, p. 83-88, 2006.
- HATAKKA A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.

HEINFLING, A.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 2788-2793, 1998.

HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; SALCEDO-MARTÍNEZ, S. M. Screening for decolorizing basidiomycetes in México: Screening and selection of ligninolytic basidiomycetes with decolorizing ability in Northeast México. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 465–473, 2008.

HIGSON, F. K. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. In: Ware G.W. (Ed.) **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 122-125.

HIGUCHI T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. **Wood Science and Technology**, New York, v. 24 p. 23–63, 1990.

_____. Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 80, p. 204-214, 2004.

HOFER, C.; SCHLOSSER, D. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 451, p. 186-190, 1999.

HOFF, T.; LIU, S. Y.; BOLLAG, J.M. Transformation of Halogen-, Alkyl-, and Alkoxy-Substituted Anilines by a Laccase of *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 49, n. 5, p. 1040-1045, 1985.

HOFRICHTER, M. Mangan-Peroxidasen: enzymatische verbrennung von lignin. **BioSpektrum**, Helsinki, v. 6, p. 198-199, 2000.

_____. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 30, p. 454-466, 2002.

HOFRICHTER, M., VARES, T., SCHEIBNER, K., GALKIN, S., SIPILA, J.; HATAKKA, A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 67, p. 217-228, 1998.

HOFRICHTER, M., VARES, T., KALSI, M., GALKIN, S., SCHEIBNER, K., FRITSCH, W.; HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (14C-DHP) during solidstate fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1864-1870, 1999.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I.D.; SMITH, D.W. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **Journal of Environmental of Engineering and Science**, Vancouver, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2004.

ISRAEL, C. M. **Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero *Polyporus***. 2005. 136p: Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

ITOH, K. Decolorization and degradation of methylene blue by *Arthrobacter globiformis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 75, p. 1131–1136, 2005.

JARDIM, G. M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do Rio Corumbataí**. 2004. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

JARVIS, M. Cellulose stacks up. **Nature**, London, v. 426, p.611-612, 2003.

JIMNEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTIN, A. Aerobic–anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 9, 1275–1284, 2003.

JONSSON, C.M. **Fosfatase ácida da microalga *Selenastrum capricornutum*: extração, caracterização e efeito de poluentes de origem agrícola**. 2005. 133 p. Dissertação (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

JÖNSSON, L. J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N. O.; HAHN-HÄGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, p. 691-697, 1998.

JØRGENSEN, H.; MØRKEBERG, A.; KROGH, K.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 36, p. 42-48, 2005.

JUHA´SZ, T.; SZENGYEL, Z.; RE´CZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, Londres, v. 40, p. 3519–3525, 2005.

KAHRAMAN, S.S.; GURDAL, I.H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 215-217, 2002.

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajoi-caju*. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p. 629-632, 2005.

KANNAN, A.; UPRETI, R.K. Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 609–615, 2008.

KAWASAKI, L.; AGUIRRE, J. Multiple CAT genes are differentially regulated in *A. nudulans*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.183, p.1434-1440, 2001.

KAWASAKI, L.; WYSONG, D.; DIAMOND, R.; AGUIRRE, J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 3284-3292, 1997.

KEITH, K.E.; VALVANO, M.A. Characterization of SOD-C, a periplasmic SOD from *Burkholderia cenocepacia*. **Infection and Immunity**, Bethesda, v.75, p.2451-2460, May, 2007.

KEREM, Z.; FRIESEM, D.; HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, n. 4, p. 1121-1127, 1992.

KERSTEN, P. J.; KALYANARAMAN, B.; HAMMEL, K. E.; REINHAMMAR, B.; KIRK, T. K. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. **Biochemical Journal**, Colchester , v. 268, p. 475-480, 1990.

KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 588-592, 2004.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 8, p. 27-32, 1986.

KIRK, T.K.; CULLEN, D.; Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: KIRK, T.K. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley & Sons 1998. p. 273-308.

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KLYOSOV, A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation, **Biochemistry**, Washington, v. 29, p. 10577-10585, 1990.

KRAUS, T.E.; EVANS, R.C.; FLETCHER, R.A. PAULS, K.P. Paclobutrazol enhances tolerance to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 73, p. 797-806, 1995.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, Berlin v. 57, p. 45-126, 1997.

KUMAR, S.; GOPAL, K. Impact of distillery effluent on physiological consequences in the freshwater teleost *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 66, n. 5, p. 617-622, 2001.

- KUMAR, S.; SAHAY, S.S.; SINHA, M.K. Bioassay of distillery effluent on Common Guppy, *Lebistes reticulatus* (Peter). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, n.2, p. 309–316, 1995.
- KUMAR, V.; WATI, L.; NIGAM, P.; BANAT, I. M.; YADAV, B. S.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 83-88, 1998.
- KUMAR, V.; WATI, L.; FITZGIBBON, F.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Bioremediation and decolorization of anaerobically digested distillery spent wash. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 19, n. 4, p. 311–313, 1997.
- KUMARAN, S.; SASTRY, C. A.; VIKINESWARY, S. Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 13, p. 43-49, 1997.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LANG, E.; NERUD, F.; NOVOTNÁ, E.; ZADRAZIL, F.; MARTENS, R. Production of lignolytic exoenzymes and C¹⁴ – pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose. **Folia Microbiologica**, Praga, v.41, n.6, p. 489-493, 1996.
- LANGH, E.; ELLER, G.; ZADRAZIL, F. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 34, p. 1-10, 1997.
- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress induced changes of antioxidants enzymes in the leaves of cucumber. In gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Limerik, v.159, p. 75-85, 2000.
- LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, p.261-268, 2003.
- LEITE, G. F. Avaliação econômica da adubação com vinhaça e da adubação mineral de soqueiras de cana-de-açúcar na Usina Monte Alegre Ltda. – Monte Belo – MG. **Revista Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 5, p. 189-191, 1999.
- LEISOLA, M.S.A.; FLETCHER, A. New trends in lignin biodegradation. In: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. **Advances in biotechnological process 5**. New York: Alan R. Liss Inc., 1985. p.59-89.
- LEONOWICZ, A.; MATUSZEWSKA, A.; LUTEREK, J.; ZIEGENHAGEN, D.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; CHO, N.S.; HOFRICHTER, M.; ROGALSKI, J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**, New York, v. 27, p. 175-185, 1999.

LESCHINE, S. Cellulose degradation in anaerobic environments. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 399-426, 1995.

LESSER, M.P.; STOCHAJ, W.R. Protoadaptation and protection against active forms of oxygen in the symbiotic prokaryote *Prochloron sp* and its ascidian host. **Applied Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 56, p. 1530-1535, 1990.

LI, Q.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 44, p. 394-40, 2008.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K.E.L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n. 6, p. 2654-2660, 1999.

LOBARZENWSKI, J. The characteristics and functions of the peroxidases from *Trametes versicolor* in lignin biotransformation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 13, p.11-117, 1990.

LOBOS, S.; LARRAÍN, J.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUNA, R. 1994. Isozymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, v. 140, p. 1691-1698, 1994.

LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; HATAKKA, A. Metabolism of veratric acid by lignin-degrading white-rot fungi. **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**, Buttee, v. 2 p. 387, 1990.

MACHADO, K.M.G. **Biodegradação de Pentaclorofenol por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos em solos contaminados com resíduos industriais**. 1998. 172p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 297-310, 2005a.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R. Ligninolytic enzymes production and Remazol Brilliant Blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 246-252, 2005b.

MAHALINGAM, R; FEDEROFF, N. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.119, p.56-68, Sep, 2003.

MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HUTTERMANN, A. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 267-276, 1999.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.

MANE, J.D.; MODI, S.; NAGAWADE, S.; PHADNIS, S.P.; BHANDARI, V.M. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 1752-1755, 2006.

MARTINS, P.F. **Análise da resposta antioxidativa bacteriana ao herbicida s-metolachlor**. 2007. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MASAPHY, S.; LEVANON, D. The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonaris* in submerged culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 828-832, 1992.

MASSARO, F.C. **Estudos ecotoxicológicos com *Hydra viridissima* (Cnidária Hydrozoa)**. 2006 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MATES, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Amsterdam, v.133, .83-104, 2000.

MATKAR, L.S.; GANGOTRI, M.S. Acute toxicity tests of sugar industrial effluents on the freshwater crab, *Barytelphusa guerini* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Potamidea). **Pollution Research**, Nova Deli, v. 22, p. 269–276, 2003.

MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L.R.; MACHADO, K.M.G. **New basidiomycetes on bioremediation of organochlorine contaminated soil**. In: GLENN, V.S.M., ONG, J.S.K.; LEESON, A. (Ed.) *Bioremediation of Energetics, Phenolics, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. San Diego, Battelle Press, 2001. v. 3, p. 99-106.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, New York, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of Basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 77-84, 1999.

McCORDE, J.M.; FRIDOVICK, I. SOD: an enzymatic function for erythrocuprien (emocuprien). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.244, p.6049-6055, Nov, 1969.

- MELETTI, P. C. **Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Piracicaba, SP, através de parâmetros ecotoxicológicos**. 1997. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- MELLO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa - Meio Ambiente, 2008. v. 2, p. 304-319.
- MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.
- MESSIAS, T.G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí**. 2008. 126p. Dissertação (Mestrado em Química na Agricultura e no ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- MICHEL, F. C. Jr.; DASS, S. B.; GRULKE, E. A.; REDDY, C. A. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, n. 8, p. 2368-2375, 1991.
- MIGO, V.P.; MATSUMURA, M.; ERNESTO, J.D.R. Decolourization of molasses waste water using an inorganic flocculent. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v.75, n. 6, p. 438, 1993.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-429, 1959.
- MIRANDA, P.M.; BENITO, G.G.; CRISTOBAL, N.S.; NIETO, C.H. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 57, n.3, p. 229–235, 1996.
- MOHAMMAD, P.; AZARMIDOKHT, H.; FATOLLAH, M.; MAHBOUBEH, B. Application of response surface methodology for optimization of important parameters in decolorizing treated distillery wastewater using *Aspergillus fumigatus* UB2.60, **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 57, n. 4, p. 195–199, 2006.
- MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**. (2008), doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.079.
- MOREIRA NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. 2006. 124 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

MOUGIN, C.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; MADZAK, C. 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. **Environmental Chemistry Letters**, Heidelberg, v. 1, p. 145-148, 2003.

NAIK, N. M.; JAGADEESH, K.S.; ALAGAWADI, A.R. Microbial decolorization of spentwash: a review. **Indian Journal of Microbiology**, Nova Delhi, v. 48, p. 41-48, 2008.

NIDETZKY, B.; STEINER, W. A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.42, p. 469-479, 1994.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergism interaction. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 298, p. 705-710, 1994.

NOVENTA-JORDÃO, M.A.; COUTO, R.M.; GOLDMAN, M.H.; AGUIRRE, J.; IYER, S.; CAPLAN, A.; TERENCEZI, H.F.; GOLDMAN, G.H. Catalase activity is necessary for heat-shock recovery in *Aspergillus nidulans* germlings. **Microbiology**, New York, v. 145, p. 3229-3234, 1999.

NOVIKOVA, L.N; MEDVEDEVA, S.A; VOLCHATOVA, I.V.; BOGATYREVA, S.A. Changes in Macromolecular characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.38, p. 181-185, 2002.

NOVOTNY, C.; ERBANOVA, P.; ŠAŠEK, V.; KUBATOVA, A.; CAJTHAML, T.; LANG, E.; KRAHL, J.; ZADRAŽIL, F. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 10, p. 159-168, 1999.

NOVOTNY, C.; RAWAL, B.; BHATT, M.; PATEL, M.; SASEK, V.; MOLITORIS, H. P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, p. 113-122, 2001.

NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 36, p. 1545-1551, 2004.

OECD. **Guidelines for testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test**, n. 211. Paris, 1998.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 420 p.

OHMOMO, S.; DAENGSUBHA, W.; YOSHIKAWA, H.; YUI, M.; NOZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; NAKAMURA, I. Screening of anaerobic bacteria with the ability to decolorize molasses melanoidin. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 52, 2429-2435, 1988.

OHMOMO, S.; KANEKO, Y.; SIRIANUNTAPIBOON, S.; SOMCHAL, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; NAKAMURA, I. Decolorization of molasses wastewater by a thermophilic strain, *Aspergillus fumigatus* G-2-6. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, Tokio, v. 51, p. 3339–3346, 1987.

OKAMOTO, O.K. et al. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.40, p.18-24, Jan, 2001.

OLIVEIRA, A. C. **Toxicidade de elementos-traços para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cianophyceae)**. 2007. 183 p. Dissertação (Mestrado em ciências da engenharia ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B.; SANNIA, G. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 920-924, 2000.

PALMIERI G, GIARDINA P, BIANCO C, SCALONI A, CAPASSO A, SANNIA G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, p. 31301–31307, 1997.

PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. VTT: Espoo, 2004. 80 p.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, n. 74, p. 69-80, 2000.

PANT, D.; ADHOLEYA, A. Identification, Ligninolytic enzyme activity and decolorization potential of two fungi isolated from a distillery effluent contaminated site, **Water, Air and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 183, n. 1-4, p. 165–176, 2007.

PASCHOLATTI, S.F.; STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E. **Cogumelos – cultivo e comercialização: shiitake e cogumel do sol**. Cuiabá: SEBRAE –MT., 1998. 85p. (Coleção Agroindústria).

PENNINCKX, M. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.26, p.737-742, 2000.

PÉREZ, S.R.; SAVÓN, R.C.B.; DIAZ, M.S.; KOUROUMA, A. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. **Revista Mexicana de Micología**, México, v. 23, p. 9-15, 2006.

POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; VITORELLO, V.A.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 548-552, 2008.

PRADA, S.M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M.E. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 249-252, maio/jun. 1998.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **O reino dos fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998. 202p.

RADY, A.A.; EL-SHEEKH, M.M.; MATROVICS, B. Temperature shift-induced changes in the antioxidant enzyme system of cyanobacterium *Synechosystis* PCC6803. **International Journal Biochemistry**, Bristol, v. 26, p. 433-435, 1994.

RAJARATHANAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialities of the basidiomacromycetes. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 37, p. 233-361, 1992.

RAJARATHANAN, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n.1, p.31-113, 1989.

RAMAKRITINAN, C.M.; KUMARAGURU, A.K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Impact of distillery effluent on carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology**, Amsterdam, v. 14, n.7, p. 693-707, 2005.

REDDY, C.A. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, p. 91-107, 1993.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H.; VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed.). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 22, 291p.

RODRIGUES, L. H. R. **Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrometria**. 2002. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

RODRÍGUEZ, E; PICKARD, M.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, New York, v. 38, p. 27-31, 1999.

RODRÍGUEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BERMÚDEZ, R. C.; MORRIS, H. Tratamiento de efluentes industriales coloreados com *Pleurotus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, México, v. 20, p. 164-168, 2003.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Teresópolis: Editora Eventos, 2002.

SALLES, L.S. **Elementos para o planejamento ambiental do complexo agroindustrial sucroalcooleiro no Estado de São Paulo: conceitos, aspectos e métodos**. 1993. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1993.

SANTOS, M. A. P. F. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos**. 2008. 186 p. Tese (Doutorado em Química do Meio Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R. Sensitivity of four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, p. 229-236, 2007.

SAPARRAT, M.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A.M.; MARTINEZ, A.T.; MARTINEZ, M.J. Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 1534-1540, 2002.

SAYADI, S.; ELLOUZ, R. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete crysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 3, p. 1098-1103, 1995.

SAXENA, K.K.; CHAUHAN, R.R.S. Oxygen consumption in fish, *Labeo rohita* (HAM.) caused by distillery effluent. **Ecology, Environment and Conservation**, Nova Deli, v.9, n.3, p. 357-360, 2003.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In: FOYER, C.H.; MULIUNEAUX, P.M. (Ed.). **Causes of photoxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Flórida: CRC Press, 1994, p. 275-315.

SCHLIEPHAKE, K.; LONERGAN, G. T. Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 18, p. 881-886, 1996.

SCHLOSSER, D., GREY, R., FRITSCH, W. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 47, p. 412-418, 1997.

SCHLOSSER, D.; HÖFER, C. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn^{2+} in the Presence of Natural Mn^{3+} Chelators as a Novel Source of Extracellular H_2O_2 Production and Its Impact on Manganese Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, n. 7, p. 3514-3521, 2002.

SCHNEIDER, P.; CASPERSEN, M.B.; MONDORF, K.; HALKIER, T.; SKOV, L.K.; OSTERGAARD, P. R. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 25, n. 6, p. 502-508, 1999.

SCHWARZ, W. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, p. 634-649, 2001.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICRO E PEQUENAS EMPRESAS – SEBRAE. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/paginaInicial>. Acesso em: 10 jun. 2009.

SHAYEGAN, J.; PAZOUKI, M.; AFSHARI, A. Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3-4, p. 1323–1329, 2004.

SHAN, V.; NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 857-870, 2002.

SHLEEV, S.V.; MOROZOVA, O.V.; NIKITINA, O.V.; GORSHINA, E.S.; RUSINOVA, T.V.; SEREZHENKOV, V.A.; BURBAEV, D.S.; GAZARYAN, I.; YAROLOPOV, A. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, Paris, v. 86, p. 693-703, 2004.

SHÜTZENDÜEL, A.; MAJANCHERCZK, A. A degradation of fluorene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. **International Biodeterioration**, Birmingham, v. 43, p. 93-100, 1999.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Impr. Univ. UFV, 1998. 166p.

SILVA, F.A.S. AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v.2, p.27-32, 2007.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; SIHANONTH, P.; SOMCHAI, P.; ATTHASAMPUNNA, P.; HAYASHIDA, S. An adsorption mechanism for melanoidin decolorization by *Rhizoctonia* sp., **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokio, v. 59, n. 7, p. 1185–1189, 1995.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, London, v.125, p.27-28, 1993.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 24, p. 1839-1845, 2002.

SMITH, P.; GREGORY, P.E. Analytical techniques for colour studies. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 14., 1971, New Orleans. **Proceedings...** New Orleans: ISSCT, 1971. p. 1415.

SRINIVASAN, C.; D'SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete cryso sporium* BMK-F1767. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 12, p. 4274-4277, 1995.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2nd ed. Oxford: Tarrytown, 2003. 357p.

STICKLEN, M.B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 9, p. 433-443, 2008.

SUGIURA, M.; HIRAI, H.; NISHIDA, T. Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 285-290, 2003.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY - SETAC. **Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments**. In: WORKSHOP ON SEDIMENT TOXICITY ASSESSMENT, 1993, Renesse. **Anais...** Renesse, 1993.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Tremoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 689-692, 1987.

TANAKA, M.; NAKAMURA, H.; TANIGUCHI, M.; MORITA, T.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Elucidation of adsorption processes of cellulases during hydrolysis of crystalline cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.23, p. 263-268, 1986.

TANAKA, T.; SHIMOMURA, Y.; HIMEJIMA, M.; TANIGUCHI, M.O.S. Characterization of xylan-utilizing anaerobes from mesophilic and thermophilic methane sludge and their xylan degrading enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 50, n. 9, p. 2185-2192, 1981.

TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K.N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, Columbus, v. 136, p. 131-137, 1998.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **Canoco reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998. 352 p.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E.- **Atlas del bagazo de la caña de azúcar**. México: GEPLACEA/ ICIDCA, 1990.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

TRUPKIN, S.; LEVIN, L.; FORCHIASSIN, F.; VIALE, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 682-690, 2003.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 169-183, 2000.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot-fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.41, n. 1, p. 1-17, 1995.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. São Paulo, 2009. Disponível em: < <http://www.portalunica.com.br>>. Acesso em: 05 de jun. 2009.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA - UDOP. São Paulo, 2009. Disponível em: < <http://www.udop.com.br>>. Acesso em: 05 de jun. 2009.

VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. In: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.). **Isozymes in plant genetics and breeding -Part A**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 469-516.

VANACKEN, B.; GODEFROID, L.M.; PERES, C.M.; NAVEAU, H.; AGATHOS, S.N. Mineralization of ¹⁴C- ring labeled 4-hydroxylamino-2,6- dinitrotoluene by manganese-dependent peroxidase of the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 68, p. 159-169, 1999.

VARES, T.; KALSI, M.; HATAKKA, A. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, and others ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 10, p. 3515-3520, 1995.

- VIANA, B.A. **Tratamento anaeróbio de vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica.** 2006. 88p. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- VITTI, L.S.S. **Condições de produção e atividade da celulase do fungo *Aspergillus sp* e seus mutantes isolados de bagaço de cana.** 1988. 108p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry.** 2 th ed. New York: Wiley, 1995. 1361 p.
- VYAS, B. R. M.; VOLC, J.; SASEK, V. Effects of temperature on the production of manganese peroxidase and lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 39, n.1, p. 19-22, 1994.
- WADT, L. C. **Cultivo de *Pleurotus spp.* Em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos.** 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS. S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, p. 161-187, 2003.
- WESSELS, J.G.H. Development regulation of fungal cell wall formation. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 413-437, 1994.
- WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos.** 2003. 196p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- WOOD, T.M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, Dordrecht, v.1, n. 2/3, p. 147-167, 1990.
- WOOD, T.M; MCCRAE, S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. **Advances in Chemistry Series**, Washington, v. 181, p. 181– 209, 1979.
- WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource Technology**, Essex, v. 36, n. 11, p. 67–75, 1991.
- WRIGHT, J. D. Ethanol from lignocellulosics: an overview. **Energy Progress**, New York, v. 84, n. 8, p. 71-88, 1988.
- WYMAN, C.E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnology Progress**, New York, v. 19, n.2, p. 254-262, 2003.

YAO, X-H; MIN, H; LV, Z-M. Response of SOD, CAT and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. **Biomedical and Environmental Sciences**, Orlando, v.19, p.309-314, Aug, 2006.

YAYER, D.S.; XU, F.; GOLIGHTLY, E.J.; BROWN, K.M.; BROWN, S.H.; REY, M.W.; SCHNEIDER, P.; HALKIER, T.; MONDORF, K.; DALBOGE, H. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 3, p. 834-841, 1996.

ZAGATO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2006, 464 p.

ZHANG, Y.; LYND, L. A functionally-based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 94, n. 5, p. 888-98, 2006.

ZHAO, L. H.; ZHOU, J. T.; LV, H.; ZHENG, C. L.; YANG, Y. S.; SUN, H. J.; ZHANG, X. H. Decolorization of Cotton Pulp Black Liquor by *Pleurotus ostreatus* in a Bubble-column Reactor. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 80, p. 44-48, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)